

**SUOMESSA VIJELTÄVIEN OMENALAJIKKEIDEN ALTTIUS
NEOFABRAEA -LAJIEN AIHEUTTAMALLE VARASTOLAIKULLE**

Hanna Helkkula

Maisterintutkielma

Helsingin yliopisto

Kasvipatologia

Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta

2018

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department
Tekijä/Författare – Author Hanna Helkkula		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Suomessa kasvatettavien omenalajikkeiden kestävyys <i>Neofabraea</i> -lajien aiheuttamalle varastolaikulle		
Oppiaine /Läroämne – Subject Kasvipatologia		
Työn laji/Arbetets art – Level Pro gradu	Aika/Datum – Month and year 2/2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 81
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Kotimaisen omenan kysyntä ympärivuotisesti on aiheuttanut tarvetta omenan laadun ja varastoinnin edistämiseksi. Etenkin varastotaudit madaltavat omenoiden laatua ja talviomenoiden säilyvyyttä.</p> <p>Ruotsissa omenan varastolaikku aiheuttaa lähes puolet tautien aiheuttamista varastovioituksista. Taudin oireet ovat omenassa tasaisen pyöreät nekroottiset laikut, jotka ovat litteitä tai hieman koveria. Laikut rajoittuvat omenan pintaosiin, eivätkä etene siemenkotaan asti. Väriykseltään laikut ovat tummia. Laikut aiheuttavat omenan hitaan osittaisen mädäntymisen. Varastolaikun oireet voivat näkyä jo omenatarhassa, mutta yleensä tauti alkaa oireilla noin 2–3 kuukauden jälkeen tarhassa tapahtuneesta pisaratartunnasta. Varastolaikkua omenoille aiheuttavat <i>Neofabraea alba</i>, <i>N. malicorticis</i>, <i>N. kienholzii</i> ja <i>N. perennans</i> -sienilajit.</p> <p>Tutkielman tavoitteena oli vertailla suomalaisilla omenalajikkeilla <i>Neofabrae</i> spp. aiheuttaman varastolaikun kestävyyttä, tunnistaa DNA-perusteisesti aiemmin eristetyt, Suomessa varastolaikkua aiheuttavat <i>Neofabraea</i> -suvun isolaatit ja tutkia yhteyttä omenan kypsyyssasteen ja tautialttiuden välillä. Kokeellinen osuus suoritettiin Luonnonvarakeskuksessa.</p> <p>DNA -perusteisesti isolaateista tunnistettiin kaksi taudinaiheuttajalajia: <i>Neofabraea alba</i> ja <i>Neofabraea perennans</i>. Korrelaatiota omenoiden kypsyyssasteen ja varastolaikkualttiuden välillä ei löydetty. Kestävimmät omenalajikkeet itiötartutuksissa ehjään omena-olivat Gloster ja Santana, mutta haavoitustartutuksissa tauti oireiden etenemistä hidasti nopeinten Golden Delicious.</p>		
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Varastolaikkua, <i>Neofabraea</i>, <i>Neofabraea alba</i>, <i>Neofabraea vagabunda</i>, <i>Neofabraea perennans</i></p>		
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>Viikin kampuskirjasto</p>		
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p> <p>Ohjaajat: Tuuli Haikonen Luonnonvarakeskus ja Asko Hannukkala Helsingin yliopisto.</p>		

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department	
Tekijä/Författare – Author Hanna Helkkula			
Työn nimi / Arbetets titel – Title In Finland cultivated apple cultivars susceptibility to bull's eye rot caused by <i>Neofabraea</i> sp.			
Oppiaine /Läroämne – Subject Plantpathology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's thesis	Aika/Datum – Month and year 2/2018	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 81	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Finnish consumers' desire to have Finnish apples around the year has led to need to improve storing and quality of late apple cultivars. Especially diseases decrease apple quality in storages. In Sweden bull's eye rot causes almost half of the disease losses in apple storages. Symptoms of the disease are round dark necrotic spots that slowly rot the apple to be unsaleable. These rot spots might be seen in the orchard but usually they develop after 2 to 3 months after harvest in apple storages.</p> <p>Bull's eye rot is caused by <i>Neofabraea</i> spp. Four species are known to cause the apple disease: <i>N. alba</i>, <i>N. malicorticis</i>, <i>N. kienholzii</i> and <i>N. perennans</i>.</p> <p>This study's object was to compare in Finland cultivated apple cultivars' resistance to bull's eye rot caused by <i>Neofabraea</i> spp., effect of apple ripeness to cultivars' susceptibility to the disease and identify in earlier study collected <i>Neofabraea</i> ssp. isolates with DNA technology.</p> <p>Two different <i>Neofabraea</i> sp. were identified causing bull's eye rot in the earlier collected isolates: <i>Neofabraea alba</i> and <i>Neofabraea perennans</i>. Correlation between apple ripeness and susceptibility to bull's eye rot was not found. The most resistant apple cultivars to bull's eye rot with spore inoculated cultivars were Gloster and Santana but Golden Delicious was able to slow down symptom development most in the wound inoculated cultivars.</p>			
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Bull's eye rot, <i>Neofabraea</i> ssp., <i>Neofabraea alba</i>, <i>Neofabraea vagabunda</i>, <i>Neofabraea perennans</i></p>			
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>Viikki Campus Library</p>			
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p> <p>Supervisors: Tuuli Haikonen Natural Resources Institute Finland and Asko Hannukkala University of Helsinki</p>			

Sisällys

1 JOHDANTO	7
2 OMENAN KYPSYMINEN	8
2.1 Omenan kypsyessä tapahtuvat fysiologiset muutokset	8
2.2 Varastossa tapahtuvat omenan biokemialliset ja morfologiset muutokset	9
2.3 Kuoren muutokset varastossa.....	11
2.4 Varastotauteja edistävät tekijät	12
2.4.1 Fysiologiset stressitekijät varastossa.....	12
2.4.2 Stressiä aiheuttavat mikro-organismit varastossa.	14
3 OMENAN PUOLUSTAUTUMINEN TAUDINAIHEUTTAJIA VASTAAN.....	15
4 OMENAN VARASTOLAIKKUA AIHEUTTAVA <i>NEOFABRAEA</i> SUKU	16
4.1 Fylogeneettinen luokittelu	16
4.2 <i>Neofabraea</i> spp. morfologia	17
4.3 Epidemiologia	18
4.4 Varastolaikun oireet	20
4.5 Varastolaikun torjunta	21
5 MUITA MERKITTÄVIÄ OMENAN VARASTOTAUTEJA	22
5.1 Yleisiä omenan varastotauteja Suomessa	22
5.1.1 Omenarupi.....	22
5.1.2 Muumiotauti.....	23
5.1.3 Tuppilohome	24
5.2 <i>Penicillium</i> -home	24
6 TAVOITTEET	25
7 AINEISTO JA MENETELMÄT	25
7.1 Sieni-isolaatit	25
7.2 Omenamateriaali.....	26
7.2.1 Lajikkeet ja kypsyyshavainnot	26
7.2.2 Omenoiden kokoluokittelu.....	27
7.2.3 Omenoiden kiinteyden määrittäminen.....	27
7.2.4 Omenoiden liukoisten sokerien prosenttiosuuden määrittäminen.....	28
7.2.5 Omenoiden tärkkelyspitoisuuden määrittäminen	28
7.2.6 Streifin indeksi	29

7.3 Omenoiden tartutusmenetelmät	30
7.3.1 Haavoitustartutukset	30
7.3.2 Itiötartutukset	31
7.3.2.1 Itiösuspension valmistus	31
7.3.2.2 Harsotartutukset	32
7.3.2.3 Sumutustartutus	32
7.3.3 Tartutusten havainnointi	33
7.3.3.1 Area under the disease progress curve	34
7.3.3.2 Infektioprosentin laskenta	35
7.3.3.3 Tilastolliset analyysit	35
7.4 Sieni-isolaattien DNA perusteinen tunnistus	36
7.4.1 DNA:n eristys	36
7.4.2 Multiplex PCR	38
8 TULOKSET	40
8.1 Haavoitustartutukset	40
8.1.1 Haavoitustartutukset kesälajikkeilla	40
8.1.2 Haavoitustartutukset syyslajikkeilla	41
8.1.3 Haavoitustartutukset talvilajikkeilla	44
8.2 Itiötartutukset	46
8.2.1 Harsotartutukset	46
8.2.2 Sumutustartutukset	48
8.3 Streifin indeksin vertailu	50
8.4 Sieni-isolaatit	52
8.4.1 Sieni-isolaattien DNA-perusteinen tunnistus	52
8.4.2 Sieni-isolaattien taudinaiheutuskyvyn ero	52
8.5. Yhteenveto tartutustuloksista	52
9 TULOSTEN TARKASTELU	54
9.1 Tartutustulokset	54
9.1.1 Valetartutettujen omenoiden Infektioprosentin merkitys tuloksiin sumutustartutetuissa näyteomenoissa	56
9.1.2 Eri tartutusmenetelmien tulosten eroavaisuudet	56
9.2 Streifin indeksin vaikutus varastolaikun oireiden etenemiseen	58
9.3 Sienilajien eroavaisuudet	58

10 JOHTOPÄÄTÖKSET	60
11 KIITOKSET	61
12 LÄHTEET	61
LIITE 1. TARTUTUKSISSA KÄYTETYT OMENALAJIKKEET JA KÄYTETYT TARTUTUSMENETELMÄT LAJIKKOHTAISESTI.....	67
LIITE 2. LAJIKKEIDEN AUDPC-ARVOT	69
LIITE 3 ITIÖTARTUTETTUIEN LAJIKKEIDEN TARTUTUSTEN TARTUNTAPROSENTIT	77

1 JOHDANTO

Useimmat viljeltävät hedelmät kuuluvat *Rosaceae* heimoon. Kyseinen heimo sisältää *Malus*-, *Prunus*- ja *Pyrus*- suvut, joista omena kuuluu *Malus* -sukuun. Viljelyssä käytetty tarhaomena *Malus domestica* Borkh. on mitä todennäköisimmin Kaukasukselta peräisin olevan villiomenan *M. sieversii* (Ledeb) M. Roem., metsäomenapuun *M. sylvestris* (L.) Mill. ja itäisen villiomenan *M. orientalis* Uglitzk. risteymä. Jalostuksessa käytetään myös muita omenalajeja, kuten ruusuomenapuuta *M. floribunda* Siebold ex Van Houtte. ja marjaomenapuuta *M. baccata* (L.) Borkh. rikastuttamaan tarhaomenan genomia ja tuomaan haluttuja ominaisuuksia kasvatettavaan uuteen lajikkeeseen. (Saario 2007)

Suomessa oli vuonna 2017 311 omenatilaa ja niiden yhteenlaskettu omenanviljelyn pinta-ala oli 684 ha (Luonnonvarakeskus 2017). Omenanviljelyn keskus on Ahvenanmaalla, jossa sitä viljellään 294 ha 40:llä tilalla. Mannersuomessa etenkin Varsinais-Suomessa ja läntisellä Uudellamaalla harjoitetaan omenan viljelyä. Satotasot ovat nousseet huomattavasti, sillä vuonna 2014 omenoiden keskimääräinen satotaso oli 7790 kg/ha ja jo vuonna 2016 9615 kg/ha (Luonnonvarakeskus 2017). Kotimaisen omenan kysyntä ympärivuotisesti on aiheuttanut tarvetta omenan laadun ja varastoinnin edistämiseksi. Etenkin varastotaudit madaltavat omenoiden laatua ja talviomenoiden säilyvyyttä.

Ruotsissa omenan varastolaikku aiheuttaa lähes puolet tautivioituksista varastossa (Tahir ym. 2014). Tauti oireilee varastossa, jossa se voi pilata jo kerätyn sadon myyntikunnottomaksi. Varastolaikkua omenoille aiheuttavat *Neofabraea alba* (E.J. Guthrie) Verkley, *N. malicorticis* H.S. Jacks, *N. kienholzii* (Seifert, Spotts ja Lévesque) Spotts, Lévesque & Seifert ja *N. perennas* Kienholz. -sienilajit. Oireina varastolaikku ilmenee ruskeina litteinä hieman sisään painuneina nekroottisina laikkuna omenan pinnassa. Ilmastomuutoksesta johtuva Suomen sademäärien lisääntyminen ja omenoiden pidemmät varastointiajat tuovat uusia haasteita, kuten varastolaikun oireiden lisääntymisen varastossa,

Suomen omenataloudelle. Tämä tutkielma on osa Pohjoismaista Nordic Apples –esijalostushanketta, jossa mm. kehitettiin menetelmiä omenan taudinkestävyyden mittaamiseksi.

2 OMENAN KYPSYMINEN

2.1 Omenan kypsyessä tapahtuvat fysiologiset muutokset

Omenan kypsyessä hedelmässä tapahtuu monenlaisia muutoksia. Soluhengitys lisääntyy, klorofyllin määrä hedelmässä vähenee, jolloin myös hedelmän väritys muuttuu, karotenoidien synteesi, ominaisten makua- ja hajua-antavien komponenttien kerääntyminen sekä soluseiniä hajottavien entsyymien ja etyleenin lisääntyminen hedelmässä alkaa (Brady 1987). Solukalvon läpäisevyys ja soluseinien paksuus sekä vesipitoisuus muuttuvat ja solunsisäinen tilavuus lisääntyy. Soluseinästä sokerit voivat muovaantua liukoiksi sokereiksi selluloosasta ja varastosokerit hydrolysoituvat. Lisäksi kypsymiseen liittyvien geenien ilmeneminen ja ennalta-kertyneiden proteiinien aktiivisuus kasvaa. Nämä tekijät yhdessä muokkaavat raaka-asta hedelmästä mehukkaan ja pehmeän maukkaan hedelmän. (Prasanna ym. 2007)

Pektiinit ovat yksiä primaarisen soluseinän ja solukalvojen päärakennuskomponentteja. Ne pitävät solurakenteen tiiviisti kasassa. Pektiinien hajoaminen on yksi hedelmien pehmenemisen osatekijä kypsymisen alkaessa. Protopektiinit, liukenemattomat suurimolekyyllipainoiset pektiinit, muuntuvat liukoiksi polyuronideiksi ja muiksi liukoiksi orgaanisiksi yhdisteiksi. Nämä pienemmät polyuroinidit ovat löyhästi kiinni soluseinässä toisin kuin alkuperäiset protopektiinit, jotka olivat tiiviisti kiinni soluseinässä pitäen soluseinää kasassa. Protopektiinien hajoamistuotteet myös depolymerisoidaan ja de-esteroidaan, mikä muokkaa niistä yhä pienempiä yhdisteitä. (Prasanna ym. 2007)

Hedelmän kypsyessä soluseinää hydrolysoivat entsyymit hydrolysoivat myös pektiinien vapaita sokerihaaroja muovaten niiden rakennetta edelleen. Solukalvon ja soluseinän hemiselluloosapitoisuus laskee rajusti hydrolyysin ja sellulyyttisten entsyymien vaikutuksesta (Prasanna ym. 2007). Sellulyyttiset entsyymien on osoitettu osallistuvan solukalvon hajotukseen ja soluseinän heikentymiseen hedelmän kypsyessä (Knee 1973).

Etyleni ja abskissihappo (ABA) ovat hedelmän kypsymisessä kaksi päähormonia, mutta myös muita hormoneja ja proteiineja osallistuu hedelmän kypsymisessä tapahtuviin biokemiallisiin muutoksiin. Kypsymisvaiheen etyleenikonsentraatiota säädelään amoinosyklopropanikarboksyli (ACC) -synteesientsyymien ja ACC-oksideasientsyymien kautta. Auksiinin johdannainen indolyli-3-etikkahappo (IAA) ja etyleeni ovat vuorovaikutuksessa keskenään kypsymisen aikana. Niiden konsentraatiot kasvavat yhtäaikaaisesti ja ne säätelevät toistensa toimintaa kypsymisprosessin aikana. Etyleni osallistuu myös karotenoidien- ja antosyanidiensynteesin indusoitumiseen, sekä edesauttaa vihreän värin hajoamista osallistuen näin värinmuodostumiseen kypsyvässä hedelmässä (Johnston ym. 2009). Myös ABA osallistuu värillisten yhdisteiden syntetisoimiseen, mutta se on riippuvainen etyleenistä. Etyleni osallistuu hedelmän kypsymisessä myös indusoimalla soluseinien hydrolyysiä (Brady 1987) ja osallistumalla omenalle tyypillisten aromienmuodostamiseen. ABA on lisäksi mukana sokerien muovaantumiseen liukoiksi ja kertymisessä hedelmässä (Kumar ym. 2014).

2.2 Varastossa tapahtuvat omenan biokemialliset ja morfologiset muutokset

Varastossa omena jatkaa elintoimintojaan itsenäisenä. Ympäristö ja olosuhteet ovat muuttuneet eikä omena saa enää puulta ravinteita, vettä tai fotosynteesituotteita. Se jatkaa silti soluhengitystä ja sen sisäiset biokemialliset reaktiot jatkuvat.

Fotosynteesi tuottaa hiilihydraatteja, joita kasvi varastoi ja käyttää kasvuun. Soluhengitys vapauttaa näitä kyseisiä hiilihydraatteja käyttöön. Yksinkertaistettuna määritelmänä soluhengityksessä sokereista muokataan hapen kanssa hiilidioksidia, vettä ja kasvin tarvitsemaa energiaa. Varastossa kerätyistä omenoissa tapahtuu edelleen soluhengitystä, mikä muokkaa omenan hiilihydraattikoostumusta. Varastoidun energian muokkaaminen ja käyttäminen laskee näin ollen omenan energiasisältöä. Varastoilman happi- ja hiilidioksidipitoisuuksia säätelemällä voidaan vaikuttaa soluhengityksen aktiivisuuteen. Alhainen happitaso hidastaa soluhengitystä samoin kuin korkea hiilidioksidipitoisuus, mikä pidentää omenoiden varastointiaikaa. (Kays ja Paull 2004a)

Sokereita omenassa on painoon nähden noin 11,6 %, josta glukoosia 1,7 %, fruktoosia 6,1 % ja sakkaroosia 3,6 %. Monosakkaridit, kuten glukoosi ja fruktoosi ovat liukoisia sokereita, niin kuin myös oligosakkaridit kuten sakkaroosi. Tärkkelys on hiilihydraattien päävarastointimuoto. Hedelmien makeus kypsyessä muodostuu juuri tärkkelyksen hajoamisesta liukoiseksi glukoosiksi ja maltoosiksi (monosakkaridi). Jo aiemmin mainittu pektiinin hydroloituminen ja liukoisten pektiinien konsentraation nousu jatkuu varastossa pehmentäen hedelmää. (Kays ja Paull 2004a)

Orgaaniset hapot ovat keskeisessä osassa omenoiden sadonkorjuun jälkeisessä aineenvaihdunnassa. Ne osallistuvat muun muassa soluhengitykseen (trikarboksyliihapposykli) ja fotosynteesiin (fosfoglyseriinihappo). Suuret konsentraatiot happoja voivat toimia valmiiksi saatavilla olevana energiana, joka otetaan käyttöön sadonkorjuun jälkeen. Orgaaniset hapot sisältävät hedelmälle ominaisia maku- ja hajukomponentteja, kuten estereitä, ollen näin erittäin tärkeitä hedelmien myyntiarvolle. Sadonkorjuun jälkeen varasto-oloissa orgaanisten happojen määrä muuttuu, osan konsentraatiot laskevat, kun taas osan nousevat. Kontrolloiduissa kaasuoloissa varastoissa voidaan vähentää happojen konsentraatioiden muuttumista, näin saaden tuoreelle omenalle ominaisen maun ja värityksen säilymään pidempään. (Kays ja Paull 2004a)

Varastossa omenoissa tapahtuu edelleen metabolisia muutoksia. Proteiinisynteesi omenassa jatkuu. Omenan kypsyminen varastossa muuttaa hedelmän proteiini- ja aminohappokoostumusta radikaalisti verrattaessa puussa olevaan hedelmään. Proteiinien, kuten malaattientsyymien, konsentraatiot omenassa kasvavat. Malaattientsyymi osallistuu mm. sitruunahappokiertoon, mikä vapauttaa mitokondrioissa kasville energiaa kasvaa omenoissa merkittävästi niiden kypsyessä. Aminohappojen konsentraatioiden muutokset ja uusien proteiinien, kuten kypsymiseen liittyvien entsyymien, syntetisoinnilla on merkittävä vaikutus omenan kypsymisessä. Esimerkiksi peroksidaasin ja esteraasin aktiivisuus lisääntyvät hedelmän kypsymisen edetessä. Näiden entsyymien toiminnan estäminen kasvissa hidastaa kypsymisen ja ikääntymisen etenemistä. (Kays ja Paull 2004a)

2.3 Kuoren muutokset varastossa

Kuori suojaa omenaa ulkopuolelta tulevilta stressitekijöiltä ja estää liiallisen haihduttamisen. Kuori koostuu epidermistä, jota päällystää kutikula, sekä monikerroksisesta hypodermistä, joka on solukerros heti epidermin alla. Kutikulakerros on erittäin tärkeä ja monimutkainen vahamainen kerros kuoren pinnalla suojaamassa omenaa. Se koostuu suurimmaksi osaksi lipideistä ja polysakkareideista, mutta sisältää myös alkoholeja, aldehydeja, estereitä, rasvahappoja, dioleita, terpenoideja ja fenolisia yhdisteitä (Bianchi 1995). Kutikulassa on polysakkareita, jotka muodostavat verkkomaisen rakenteen, jota pitkin sen rasvamolekyylien liikkuminen ja veden haihtuminen tapahtuu (Neinhuis ym. 2001). Kutikulan rakenne vaihtelee ympäristön stressitekijöiden vaikutuksesta (Rinallo ja Mori 1996).

Varastossa omenan kutikula paksuuntuu ja sen uloimmassa kerroksessa tapahtuu rakenteellisia muutoksia. Etenkin aurinkopuolella kutikulan paksuuntuminen on huomattavaa. Kristallisoituneen- ja amorfisenvahan suhteet vaihtelevat lajike- ja varasto-olosuhdekohtaisesti. Näiden kahden olomuodon suurin ero on, että kristallisoitunut vaha ei läpäise

vettä, kun taas amorfinen vaha läpäisee. Omenat siis haihduttavat vähemmän vettä, jos niiden kutikulassa on paljon kristallisoituneita vahoja. Rakenteellisesti amorfista vahaa on vähemmän kuin kristallisoitunutta. Onkin esitetty hypoteesi, että kristallisoitunutta vahaa muodostuu amorfisesta vahasta (Koch ym. 2006).

Mikrohalkeamat kutikulassa syventyvät ja uusia mikrohalkeamia syntyy omenoiden ollessa varastossa. Halkeamat eivät ylety epidermin soluseinien läpi vaan ovat pinnallisia. Ne lisäävät kutikulaarista transpiraatiota ja kutikulan läpäisevyyttä heikentäen näin kutikulan suojatehoa. Vaharakenteiden asettelu kutikulassa kuoren pinnalla ei ole sattumanvaraista (Koch ym. 2004). Rakenteet asettuvat mikrohalkeamien ja korkkihuokosten päälle ja reunamille suojaamaan omenaa ja estämään haihdutusta.

Epidermin rakenne muuttuu varastossa epätasaiseksi. Solujen suuret vakuolit kuihtuvat varastojakson aikana, mikä selittyy omenan varastoaineiden käytöllä ja haihdutuksella. Epidermin sytoplasma jakaantuu pieniksi osajoukoiksi, joissa on pieni vakuoli, mitokondrio sekä tärkkelysjyväsiä. Kutikula tunkeutuu epidermin pintasolujen päälle ja väleihin suojaten kerrosta (Konarska 2013).

2.4 Varastotauteja edistävät tekijät

2.4.1 Fysiologiset stressitekijät varastossa

Omenoilla on huomattu alhaisten lämpötilojen pidentävän niiden varastoikää. Kuitenkin alle 0 °C asteen mentäessä hedelmä kärsii vaurioita varastossa. Tarkemmin tarkasteltuna omenat kärsivät alle -1,1 °C lämpötiloista. Tämän ollen omenoiden yleinen korkein jäätymispiste, jonka jälkeen omenoissa alkaa näkyä pakkasvaurioita. (Kays ja Paull 2004b)

Jäätyminen alkaa solujen ulkopuolisen veden kiteytymisenä. Jäätyvän veden joukossa olevat suolat jäävät jääkristallien ulkopuolelle, mikä lisää solujen ulkopuolisen jäätymätömän veden osmoottista potentiaalia. Tämä johtaa veden siirtymiseen osmoottisesti solun sisältä solun ulkopuolelle. Veden siirtyminen solujen ulkopuolelle nostaa suolojen ja orgaanisten aineiden konsentraatiota solun sisällä sekä ulkopuolella alentaen solujen jäätymispistettä. Toisinaan hidas jäätyminen estää solujen sisäisen kiteiden muodostumisen. Jääkiteet rikkovat solujen rakennetta vahingoittaen muun muassa plasmamembraania ja soluseiniä, rikkoen näin omenan solukkoa ja muodostaen vetisiä vaurioita hedelmään. (Kays ja Paull 2004b)

Omenoiden kauppakuntoisuus laskee nopeasti niiden menettäessä kosteutta varastossa. 5 %:n kokonaisveden haihtuminen tekee omenasta jo myyntikelvottoman. Koostumus muuttuu vähemmän rapeaksi ja kiinteäksi, mikä vaikeuttaa omenan myyntiä. Haihtumista estetään pitämällä varastoa kosteana. Ts. vesihöyryn kyllästymisvajausta pidetään alhaisena varastossa, jotta hedelmä haihduttaa vettä mahdollisimman vähän. Suositeltu ilmankosteus on 90 - 95 %. Erittäin korkea kosteusprosentti (> 95 %) edesauttaa sienten ja bakteerien kasvua, mikä heikentää omenoiden kauppakuntoa. Alhainen < 80 % ilmankosteus ei estä omenan haihdutusta, mikä myös heikentää omenoiden kauppakuntoisuutta. (Kays ja Paull 2004b)

Kaasujen liiallisen korkeat tai alhaiset pitoisuudet varastossa voivat aiheuttaa stressiä omenoille. Happipitoisuuden laskeminen hidastaa omenan metaboliaa pidentäen varastointiaikaa, mutta voi aiheuttaa myös vaurioita. Optimaalinen happipitoisuus varastossa vaihtelee lajikekohtaisesti. Esimerkiksi Golden Delicious -lajikkeella optimaalinen varaston happipitoisuus on 5 % 2,5 °C:ssa, mutta Bramley's Seedling -lajikkeella se on jo 11–13 % 3–4 °C:ssa. Liian alhaisissa happiolosuhteissa vaurion huomaa muuttuneessa hedelmän aromissa ja maussa. Liian alhaisesta happipitoisuudesta johtuvia vaurioita ilmenee

kun omenan sisäinen happipitoisuus laskee alle 0,2 %:n. Varaston happipitoisuus on tällöin noin 2–3 %, riippuen varaston lämpötilasta. Hiilidioksidipitoisuuden nostaminen varastossa hidastaa soluhengitystä, mutta liian korkea hiilidioksidi pitoisuus voi aiheuttaa haitallisten aineiden kerääntymistä hedelmässä. Tämä on nähtävissä fysiologisina muutoksina omenassa, kuten siemenkodan tummumisena ja omenan halkeiluna. Optimaalinen hiilidioksidipitoisuus vaihtelee lajikekohtaisesti, kuten happipitoisuuskin. Golden Delicious -lajikkeella se on 5 % ja Bramley's Seedling -lajikkeella 8–10 %. Etyleenipitoisuuksien kerääntyminen varastoilmaan huonon ilmanvaihdon takia nopeuttaa omenoiden senesenssiä, lyhentäen näin omenana varastoikää. (Kays ja Paull 2004b).

Kaikki nämä tekijät edistävät taudinaiheuttajien mahdollisuutta päästä hedelmän solukoon ja käyttää hedelmää ravinnokseen. Solukon rikkoutuminen ja korkea kosteus siis helpottavat taudinaiheuttajan etenemistä, energian saamista ja lisääntymistä.

2.4.2 Stressiä aiheuttavat mikro-organismit varastossa.

Patogeenit aiheuttavat suurta vahinkoa varastossa. Vaikka varasto olisi itsessään puhdas omenoiden pinnalla on kymmeniä mikro-organismeja, jotka voivat aiheuttaa varastotauteja. Latenttia tai alkavaa infektiota on vaikea havaita hedelmässä, joten tartuntaa kantavia omenoita joutuu varastoon sadon mukana. Jotkut taudinaiheuttajat voivat aktivoitua vasta varastossa omenan kypsyessä ja tuottaessa tiettyjä taudinaiheuttajan kasvua edistäviä entsyymejä ja helpommin saatavilla olevia sokereita (Biggs 1995). Mekaanisten vioitusten ja kolhujen kautta taudinaiheuttajat pääsevät helposti ohittamaan omenan puolustusjärjestelmän ja leviämään haavoittuneeseen omena.

Jo omenoissa olevien taudinaiheuttajien lisäksi taudit voivat levitä varastossa itiöiden- ja rihmaston avulla omenasta toiseen. Toisiinsa kosketuksissa olevat omenat levittävät helposti viereiseen omena- sieni- rihmasto- a, jolloin tauti pääsee pesäkkeittäin leviämään varastossa. Itiöiden välityksellä tapahtuvaa taudin leviämistä tapahtuu myös varastossa. Joidenkin taudinaiheuttajien itiöt leviävät ilmanvaihdon mukana, jolloin ne voivat levitä kokovarastoon tuhoten sadon myyntikelvottomaksi päästessään itämää- n omenoissa. Itiöt aiheuttavat myös uusia tartuntoja omenassa, joka johtaa taudin kehittymiseen. (Brooks ym. 1920)

3 OMENAN PUOLUSTAUTUMINEN TAUDINAIHEUTTAJIA VASTAAN

Kasvien ensisijaisia puolustautumiskeinoja ulkoisia stressitekijöitä vastaan ovat rakenteelliset esteet, kuten paksu kuori. Omenan kuoren merkitys ulkoisten ärsykkeiden torjumisessa on merkittävä. Kuoren päällä oleva vahakerros hankaloittaa taudinaiheuttajien sisäänpääsyä ja on omenan ensimmäinen suojakerros (Konarska 2013). Itse kuori on rakenteellisesti suojana, mutta se sisältää myös paljon taudinaiheuttajille haitallisia yhdisteitä (Lata 2007).

Suurin osa omenan haitallisista yhdisteistä sijaitsee kuoressa. Siinä on erilaisia fenoleita, askorbiinihappoa ja glutatioleita. Antioksidanttiaktiivisuus on korkeinta omenankuoressa, verrattaessa muhin omenanosiin, kuten sen hedelmälihaan. Antioksidantit liittyvä suoraan oksidatiiviseen stressi- a aktivoitumiseen, joka on yksi kasvin monista puolustautumiskeinoista, kasvin tunnistessa taudinaiheuttajan hyökkäyksen. (Lata 2007)

Geeni-geeni vuorovaikutuksessa omenan R-geenit aktivoituvat kasvin puolustuksessa, mikä johtaa yliherkkyyss-reaktioon, jossa happiradikaalien avustuksella kasvi ohjel-

moidusti tappaa hyökkäyksen kohteena olevaa solukkoa (Zhang ym. 2013). Hormonaalissa porrastetussa kasvin puolustusvasteessa alkaa muodostua PR-proteiineja (pathogen related), jotka ovat erilaisia taudinaiheuttajille haitallisia proteiineja. Ne voivat olla sienille haitallisia entsyymejä, kuten glukanohydrolaaseja ja peroksidaaseja. Peroksidaasi on osa lingiinintuottomekanismia, joka paksuntaa omenan soluseiniä, hankaloittaen so-luihin tunkeutumista. Osa glukanohydrolaaseista, kuten β -1,3-glukanaasi ja kitinaasi, pystyvät hydrolysoimaan sienisolujen soluseiniä, estäen näin taudinaiheuttajan etene-mistä solukossa (Ippolito ym. 2000). Nämä tekijät yhdessä, sekä muut taudinaiheuttajan hyökkäyksen indusoimat kasvin puolustusvaste-entsyymit, määrittelevät kasvien ja lajik-keiden puolustautumiskyvyn, ja miten altis kasvi on taudille.

4 OMENAN VARASTOLAISKUA AIHEUTTAVA *NEOFABRAEA* SUKU

4.1 Fylogeneettinen luokittelu

ITS, β -tubuliineja ja mitokondriaalista rDNA:ta koodaavia alueita vertaillessa on erotettu neljä *Neofabaraea* -suvun sienilajia (de Jong ym. 2001), joiden tiedetään aiheuttavan va-rastolaikkua omenalla: *Neofabraea alba* (E.J. Guthrie) Verkley (synomyymi *Neofabraea vagabunda* (Desm.) Rossman), *N. malicorticis* H.S. Jacks, *N. kienholzii* (Seifert, Spotts ja Lévesque) Spotts, Lévesque & Seifert ja *N. perennans* Kienholz. *N. perennans* ja *N. mali-corticis* ovat kyseisistä lajeista lähintä sukua keskenään, ja ovat viimeisinä eriytyneet eri lajeiksi (de Jong ym. 2001). Varastolaikkua aiheuttavista *Neofabraea*-lajeista. Euroopassa esiintyy *N. alba*, *N. kienholzii* ja *N. perennans*, jotka on tunnistettu DNA-perusteisin me-netelmin (Michalecka ym. 2016).

Neofabraea suvun lajien morfologinen ja fylogeneettinen luokittelu on vuosien saatossa muuttunut useaan kertaan. *Neofabraea* sukua on pidetty *Gloeosporium* sukuna (von Arx

1957), *Cryptosporiopsis* sukuna (Verkley 2003) sekä sekoitettu *Pezicula* suvun lajeihin (Nannfeldt 1932). Lisäksi Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa on samasta lajista käytetty eri lajinimeä. *N. alba* oli vuoteen 1999 luokiteltu Amerikassa *Pezicula* sukuun *Pezicula alba* -nimellä, koska se on muistuttaa *Cryptosporiopsis perennans* teleomorfia. Eurooppalaiset käyttivät samasta sienestä samaan aikaan nimeä *P. malicorticis*. Nykyisin tiedetään, että *Pezicula* suku aiheuttaa harvoin kasvitauteja. Ne ovat yleisimmin saprotrofeja tai harmittomia endofyyttejä. *Neofabraea* suvun suvuttomien anaforminen luokittelu selventää tilannetta: *N. malicorticis* (anamorfi *Cryptosporiopsis curvispora*), *N. perennans* (anamorfi *C. perennans*) ja *N. alba* (anamorfi *Phlyctema vagabunda* syn. *Gloeosporium album*) (de Jong ym. 2001). *Neofabraea* suku luokitellaan nykyisin kaareen *Ascomycota*, alakaareen *Pezizomycotina*, luokkaan *Leotiomyces*, alaluokkaan *Leotiomycetidae*, lahkoon *Helotiales* ja heimoon *Dermateaceae* (Index Fungorum 2017).

4.2 *Neofabraea* spp. morfologia

Neofabraea suvun sienet ovat kotelosieniä, jotka lisääntyvät suvuttomasti kuromaitiöiden avulla tai suvullisesti maljamaisen itiöemän, kotelomaljan, avulla. Kotelomaljat kasvavat omenapuun kuorella, johon ne kiinnittyvät lyhyen varren avulla. Kotelomaljojen esiintyminen on harvinaista, mutta jos niitä esiintyy, ne esiintyvät joko yksin tai kasvavat ryppäinä alustapahkasta. Malja on halkaisijaltaan 0,5–2,0 mm. Muodoltaan se on pyöreä, soikea tai epäsäännöllinen. Kotelomaljan väri vaihtelee haalean punertavasta ruskeaan, mutta kuivuneena väri tummentuu. Itiökotelo on avoin ja se on muodoltaan pyöreän nuijamainen kärkeä kohti pyörityn. Kotelon sisällä on kahdeksan koteloiitiötä, jotka ovat muodoltaan tasaisen soikeita, nuijamaisia, ja ne ovat kalvomaisen ohutseinäisiä. Ne voivat olla kaarevia tai suoria. Koteloiitiöiden sisällä on näkyviä jyväisiä tai öljytippoja. Nesterihmat ovat itiöemässä tavattavia steriilejä rihmoja. *Neofabraea* suvulla ne ovat yksinkertaisia tai haarautuneita, jouhimaisia, sileäseinäisiä ja tylppäpäisiä. Rihmojen päätysolut ovat hieman turvonneet muihin soluihin verrattaessa. (Chen ym. 2016)

Kuromankannattimet ovat tyypillisesti joko yksinkertaisia tai haarautuneita ja sileitä. Suvuttomien kuromaitiöiden kasvu tapahtuu joko pelkästään kuromankannattimen päästä tai päästä ja sivuosista. Kuromaitiöt voivat olla mikroitiötä, makroitiötä tai näiden väli-
muotoja. Makroitiöiden avulla *Neofabraea* suvun edustajia on mahdollista tunnistaa toisistaan. Makroitiöt ovat yleensä ellipsimäisiä, suoria tai käyriä ja niiden kärjen pääty on pyöristynyt ja perä arpeutunut. Ne ovat sileitä ja niiden sisällä on useampia öljytippoja. Makroitiöiden banaaninomainen muoto kertoo kyseessä olevan *N. alba* laji, mutta käyryyttä voi esiintyä myös *N. malicorticis* -lajilla. *N. malicorticis* -lajilla itiön käyräisyys on yleensä loivempaa kuin *N. alba* -lajilla. *N. malicorticis* -lajin makroitiöt ovat tyypillisesti pitkänomaisia ellipsejä. *N. perennans* (kuva 1) ja *N. kienholzii* muodostavat suoria ellipsimäisiä makroitiöitä. (Henriquez ym. 2004, Chen ym. 2016)



Kuva 1. *N. perennans* makroitiöitä.

4.3 Epidemiologia

Neofabraea -sienet tartuttavat omenapuiden oksia, oksanhankoja, silmuja, runkoa ja muita puisia osia kuromaitiöiden avulla. *N. malicorticis* ja *N. perennans* pystyvät tartuttamaan tervettä puuainesta ilman suojaavan kuorikerroksen repeytymiä. *N. alba* taas vaatii haavauman tai muun fysiologisen vioituksen tartunnan onnistumiseksi. *N. alba* viihtyy saprofyyttinä puun hedelmien jättämissä kannoissa, puunkuoressa ja lehdistä

(Burchill ja Edney 1961, Verkely 1999) *Neofabraea* sienet alkavat muodostaa tartuttamassaan puumateriaalissa syksyisin koroa, jonka kasvaminen jatkuu läpi talven. Kesällä koron kasvu loppuu ja alkaa taas uudestaan syystalvella uusien itiöiden tartuttaessa koron reuna-alueen tervettä puuainesta (Grove 1990).

Koroista tapahtuu veden avustuksella roisketartuntaa uusiin terveisiin puuosiin ja omenoihin. Tartunta tapahtuu kuromapatjasta vapautuvien kuromaitiöiden välityksellä. Itiöitä vapautuu läpi vuoden, mutta syksyisin itiömäärä ja tartunta ovat runsaimmillaan (Edney 1964). Omenan raakileihin saavat tartunnan aikaisintaan kuukauden päästä kukinnasta. Raakileet muuttuvat alttiimmiksi tartunnalle raakileiden kehityksen edetessä. Tartunta tapahtuu hedelmään omenoiden korkkihuokosten kautta. *Neofabraea* -sieni kasvattaa tartuntarihman, jonka avulla se kiinnittyy tiukasti omenan pintaan ja toisinaan työntyy korkkihuokoseen. Tartuntarihmasta kasvaa ohut infektiorihmasto, joka kasvaa korkkihuokosen parenkyymisoluihin, mutta ei läpäise vielä korkkihuokosen alla olevaa meristeemikerrosta. Tässä latentissa tartuntavaiheessa taudinaiheuttaja pysäyttää kasvunsa ja pysyy horroksessa, kunnes hedelmä saavuttaa kypsyyssasteen, jolloin omenan solukko on niin pehmentynyt, että sieni pystyy tunkeutumaan hedelmäsolukkoon (Snowdon 1990).

Korkkihuokosten rakenteella ja korkkiutuneen kerroksen paksuudella on vaikutusta omenan varastolaikkualttiudelle. Suljetut korkkihuokokset ehkäisevät rakenteellisesti varastolaikun tarttumista. Paksu korkkikerros estää kaasujenvaihdon omenan kuoren alempien kerrosten kanssa samalla hankaloittaen sienen dormanssin purkautumista ja rihmaston kasvamista. (Verhoeff 1974)

Sienten dormanssin purkautumisen mekanismi ei ole selvä. Siihen liittyy useita fysiologisia muutoksia omenan kypsyessä. Dormanssin purkautumiseen oletetaan ainakin vaikuttavan sienille haitallisten komponenttien hajoamiseen ja ravinteiden saantiin. Vasta kypsyvässä hedelmässä sieni pystyy tuottamaan hedelmän tartuttamiseen riittävän määrän entsyymeitä (Verhoff 1974). Sienille haitallisia yhdisteitä löytyy enemmän raakileista kuin kypsistä omenoista. Mm. klorogeenisen hapon ja muiden fenolisten yhdisteiden pitoisuus laskee kuoressa, kun omena kypsyi (Hulme ja Edney 1960)

Omenan sokereiden muuttuminen helpommin käytettäväksi saattaa olla osasy dormanssin purkautumiseen. Liukoisten sokereiden konsentraation nouseminen antaa sienelle käyttöön helpommin ravintoa. Tutkimukset ovat osoittaneet, että *N. perennas* käyttää tärkkelystä huonosti hyödykseen ainoana ravintolähteenä (Borecka 1962), joten liukoisten lyhyempien sokerien lisääntynyt saatavuus voi laukaista näkyvien oireiden puhkeamisen.

Raakileen kypsyessä sen sokerikoostumuksen lisäksi soluseinien rakenne löysentyy, mikä antaa mahdollisuuden sienten entsyymeille helpommin hajottaa soluja ja näin hyödyntää soluja ravinnokseen. Pektolyttisiä entsyymeitä alkaa muodostua sienisoluisissa, kun omenan solukalvojen rakenne löystyy kypsymisen edetessä ja omenan aineenvaihdunta alkaa muuttaa protopektiinejä sienelle liukoiseen muotoon. (Verhoeff 1974)

4.4 Varastolaikun oireet

Taudin oireet ovat omenassa tasaisen pyöreät nekroottiset laikut, jotka ovat litteitä tai hieman koveria. Väriykseltään laikut ovat tummia. Laikut aiheuttavat omenan hitaan osittaisen mädäntymisen (kuva 2). Kosteissa olosuhteissa voi muodostua kuromapatjoja ja kuromaitiöitä omenan kutikulaan. Tauti oireilee 2–3 kuukauden jälkeen tartunnasta. (Verkley 2003)



Kuva 2. Varastolaikun aiheuttamia hieman kuopalle painuneita mätälaikkuja omenassa. Vaaleaa kuromaitiömassaa on nähtävissä omenan verhiön lähellä olevissa laikussa sekä niiden alapuolella olevassa laikussa. Kuva: Tuuli Haikonen Luonnonvarakeskus.

4.5 Varastolaikun torjunta

Suomessa varastolaikkua ei torjuta erikseen sille tarkoitetuilla kemiallisilla kasvinsuojeluaineilla, vaan torjunta tapahtuu omenarupea torjuttaessa omenaruven aiheuttajasieneä vastaan tarkoitetuilla kasvinsuojeluaineilla. Puut, joissa on koroja, voidaan poistaa omenatarhasta taudin leviämisen hidastamiseksi. 1969 Saksassa ja muualla Euroopassa otettiin käyttöön benomyylipohjaisia kasvinsuojeluaineita varastolaikun torjunnassa (Weber ym. 2010). 1987 raportoitiin ensimmäisistä merkeistä benomyylille resistentistä *Neofabraea* kannoista Puolassa (Bielenin 1987), ja virallisesti benomyylille resistenttikanta julkaistiin löytyneen Saksasta 2007 (Palm ja Weber 2007). Tutkimuksissa on todettu mm. pyrimetaniilin ja piraklostrobin-boskaliidi seoksen olevan hyviä torjunta-aineita kaikille varastolaikkua aiheuttaville taudinaiheuttajille (Spotts ym. 2009). On myös torjunta-aineita, jotka toimivat yhdellä *Neofabraea* lajilla, mutta eivät toisella, jolloin torjunta-ainekäyttäjän tulee tietää lajikohtaisesti, mitä *Neofabraea* -taudinaiheuttajaa

omenatarhassa esiintyy. Varastolaikun torjuntaan sopiville kemiallisille kasvinsuojeluaineille olisi siis kysyntää, samoin kun varastolaikkua hyvin kestäville omenalajikkeille.

5 MUITA MERKITTÄVIÄ OMENAN VARASTOTAUTEJA

5.1 Yleisiä omenan varastotauteja Suomessa

Suomi on pohjoisen sijaintinsa ansiosta säästynyt suurin osin useilta eteläisemmillä alueilla pahoiksi varastotaudeiksi osoittautuneilta taudeilta kuten Ruotsissa esiintyvältä *Penicillium expansum* Link. aiheuttamalta hometaudilta (Tahir ja Jönsson 2005) ja harmaahomeelta *Botrytis cinerea* Pers. (Wills ym. 1989). Ilmaston muuttuessa kosteammaksi (Hughes 2000) nämäkin hankalat varastotaudit voivat yleistyä Suomessa etenkin suurimmilla omenanviljelyalueilla Etelä-Suomessa.

Taloudellisesti merkittävimmät varastotaudit omenoilla Suomessa ovat varastossa kehittynyt omenarupi *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter, varastossa oireileva muumiotauti *Monilia fructigena* Pers., tuppilohome (*Fusarium* sp. ja *Botrytis* sp.) ja varastolaikku *Neofabraea* spp. Kyseiset sienitaudit mädättävät hedelmää varastossa tai pilaaavat omenan pintasolukkoa tehden niistä myyntikelvottomia. (Tuovinen ym. 2010)

5.1.1 Omenarupi

Venturia inaequalis -sienen aiheuttama omenarupi oireilee koko omenapuussa, mutta on helpoiten nähtävissä omenan lehdissä ja hedelmissä. Sieni talvehtii maahan pudonneissa rupisissa lehdissä, joista se kevään tullessa vapauttaa itiönsä ilmaan. Itiöitä on ilmassa jo lehtien puhjetessa ja kyseisten itiöiden lento voi kestää jopa kolme kuukautta. (Ylämäki ja Laurinen 1997).

Rupi-itiöt tartuttavat raakileita ja lehtiä. Näihin kehittyy sienikuroumia, jotka vapauttavat lisää tartutuskkyisiä itiöitä ja näin levittävät tautia. Raakileiden pinnalla sieni häiritsee omenan pintasolukon kasvua aiheuttaen halkeilua ja hedelmien toispuolisuutta. Sadonkorjuun aikaan ilmassa on vielä rupi-itiöitä. Ne kulkeutuvat korjuun aikaan varastoon ja aiheuttavat siellä sienilaikkujen kasvua omenan pintaan eli niin kutsuttua varastorupea. Omenarupi saadaan torjuttua kemiallisilla kasvinsuojeluaineilla ja vähennettyä käsittelemällä rupisia maahan pudonneita lehtiä urealla. Rupisten lehtien hävitys kauden päättyessä ehkäisee tautipainetta tulevana vuosina. (Hårdh 1955)

5.1.2 Muumiotauti

Muumiotautia aiheuttaa *Monilia fructigena* -sieni. Tauti oireilee mätänä hedelmässä pilaten hedelmän lopulta kokonaan (Jamalainen 1953). Taudinaiheuttaja pääsee omenaan halkeamien, hankaumien, ruven tai hyönteisvioletuksen kautta. Mätäkohtiin kehittyy vaaleita itiöpesäkenystyröitä, joista tauti pääsee leviämään eteenpäin hyönteisten tai veden välityksellä. Talvehtiminen tapahtuu vanhoissa puuhun jääneissä tai maahan tippuneissa omenoissa. Tautia torjutaan hävittämällä muumioituneita omenia ja leikkauksien avulla hankausten estämiseksi. Ruven ja hyönteisten torjunta kemiallisesti ehkäisee muumiotautia omenatarhoissa. (Xu ja Robinson 2000)

Varastoon muumiotauti-infektion alkuvaiheessa olevia omenoita voi päästä, sillä oireet voivat olla vielä pieniä tai muuten huomaamattomia. Varastossa taudin kehittyessä se mädättää nopeasti sairaan omenan ja tartuttaa kosketuksissa olevat muut hedelmät pilaten jo kerättyä omenasatoa. (Xu ja Robinson 2000)

5.1.3 Tuppilohome

Botrytis cinera ja *Fusarium* sp. on todettu aiheuttavan tuppilohometta (Palmiter 1951, Weber ja Dralle 2013). Tartunta tapahtuu omenan kukkiessa, mutta tauti alkaa oireilla hedelmän sisällä vasta hedelmän kypsyessä. Tauti oireilee leviämällä rihmastona omenan siemenkodassa ja mädättämällä omenaa sisältä. Tuppilohometta ei välttämättä huomaa ennen omenan halkaisua ja sitä on tästä syystä vaikeaa erotella terveistä omenoista sadonkorjuun aikana. Lajikkeet joilla on avoin siemenkodan tyvi ovat erityisen alttiita tuppilohomeelle. Hyönteislevitteisiä biologisia torjunta-aineita on otettu käyttöön tuppilohomeen torjumiseksi (Lehtonen 2016).

5.2 *Penicillium* -home

Penicillium expansum aiheuttaa ruotsissa 14 % varastotaudeista johtuvista sadon menetyksistä (Tahir ym. 2015). Se oireilee varastossa rusehtavina laikkuina, joihin alkaa lopulta kasvaa valkoista sienirihmastoa. Tautia voidaan kutsua sinihomeeksi, sillä rihmastoön muodostuvat itiöt tekevät kasvustosta vihertävän sinisen. *P. expansum* -sienten tiedetään muodostavan haitallisia toksineja, joten homeen lisäksi omenoihin alkaa muodostua haitallisia aineita, jolloin omenoista tulee käyttökelvottomia.

P. expansum -sieni leviää omenoihin haavojen ja haavaumien kautta. Kolhut, repeämät, tuholaisten tekemät reiät ym. haavat ovat *P. expansum* -homeen reittejä päästä omena. *Penicillium* spp. tavataan maa-aineksessa. Tuuli voi levittää joitakin *Penicillium* -sieniä, mutta suurin osa tartunnoista on peräisin vedestä, jossa on maa-ainesta ja *Penicillium* -sieniä. (Sanderson ja Spotts 1995)

6 TAVOITTEET

Tutkielman tavoitteena oli vertailla suomessa viljeltävien omenalajikkeiden kestävyyttä *Neofabraea* spp. aiheuttamalle varastolaikulle. Kestävyyttä taudinaiheuttajille vertailtiin sienirihmaston perustuvalla haavoitustartutusmenetelmällä ja kahdella itiötartutusmenetelmällä. Tutkittiin myös omenan kypsyysasteen vaikutusta tartutuksissa taudin kestävyydelle, omenan aurinko- ja varjopuolen varastolaikkukestävyyden eroa sekä tunnistettiin DNA-perusteisesti lajikohtaisesti aiemmin eristetyt, Suomessa varastolaikkua aiheuttavat *Neofabraea* -suvun isolaatit. Tavoitteena oli myös tutkia isolaattien taudinaiheutuskyvyn eroja.

7 AINEISTO JA MENETELMÄT

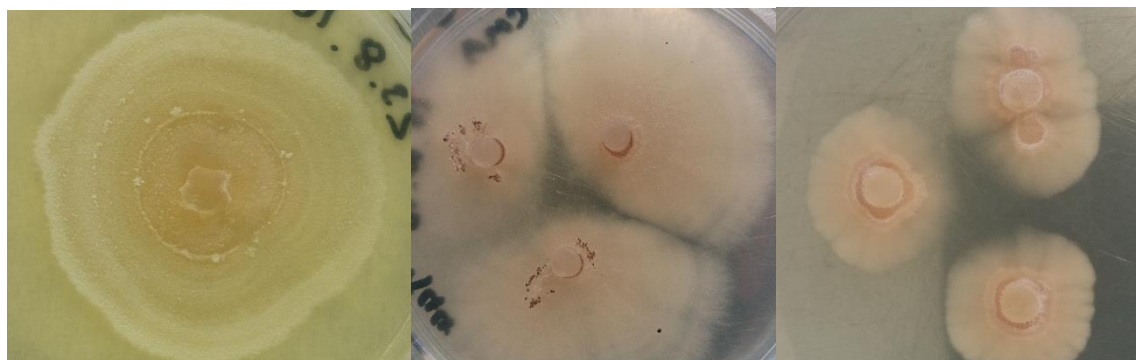
7.1 Sieni-isolaatit

Tutkimuksessa käytetyt sieni-isolaatit T21, T25, T42 ja T44 saatiin Nordic Apples -projektin (Nybom ym. 2016) aikaisemmista Suomessa tehdyistä eristyksistä. Eristykset tehtiin varastolaikkuoireellisista omenoista ja siirrettiin kasvamaan CMA- (Corn meal agar) maljoille. Maljoilta siirrostettiin omenoihin eristetyt sienet alkuperäisen eristyksen onnistumisen varmistamiseksi Kochin postulaatin mukaisesti. Morfologisen tarkastelun perusteella T21, T25, T42 ja T44 kuuluvat *Neofabraea* sukuun ja näin ollen ne valittiin käytettäviksi tartutuksissa.

Käytettäviä sieni-isolaatteja kasvatettiin ja ylläpidettiin CMA- ja PDA- (potato dextrose agar) maljoilla. PDA-maljat valmistettiin punnitsemalla 39 g PDA-jauhetta (Lab M, Neogen company) ja sekoittamalla se litraan tislattua vettä. Seos autoklavoitiin 24 minuutin ajan ja kaadettiin steriileille petrimaljoille laminaarikaapissa seoksen hieman jäähdyttyä.

CMA-maljojen teko tapahtui samoin paitsi, että CMA-jauhetta (Neogen Corporation) punnittiin 17 g.

Sienien siirrostus maljoille tapahtui laminaarikaapissa. Desinfioidulla korkkiporalla otettiin rihmasto- ja kasvualustapala vanhalta maljalta ja asetettiin se rihmastopuoli alaspäin uudelle kasvumaljalle. Koska rihmaston kasvun huomattiin olevan hidasta, laitettiin uudelle maljalle usein kolme rihmastopalaa yhdelle uudelle maljalle (kuva 3). PDA-maljoille siirrostettujen sienirihmastojen kasvu oli aluksi nopeampaa kuin CMA-maljoilla, mutta CMA-maljoilla kasvu jatkui laajemmalle alueelle kuin PDA-maljoilla. PDA-maljoilla kasvu pysähtyi muutaman viikon jälkeen. Rihmaston ikä tartutuksia tehdessä vaihteli parista viikosta kuukauteen, riippuen rihmaston kasvunopeudesta ja saatavuudesta tartutusk sien edetessä.



Kuva 3. CMA -maljoja, joilla kasvaa isolaattien T25-, T44-, ja T42-rihmastoa.

7.2 Omenamateriaali

7.2.1 Lajikkeet ja kypsyyshavainnot

Tartutuksissa käytettyjä eri lajikkeita edustavia omenanäytteitä hankittiin ammattiammiltalta omenanviljelijöiltä Varsinais-Suomesta, Pirkanmaalta, Uudeltamaalta, Kanta-Hä-

meestä ja Ahvenanmaalta. Haavoitustartutuksissa käytettiin 46 omenalajiketta ja itiötartutuksiin 26 lajiketta (liite 1). Yhteensä lajikkeita oli mukana vuoden 2016 tutkimuksessa 51. Lajikkeissa oli sekä suomalaisia paikallislajikkeita että kaupallisessa tuotannossa käytettäviä omenalajikkeita. Omenalajikkeiden joukossa oli sekä luonnonmukaisesti viljeltyjä että tavanomaisesti tuotettuja omenoita riippuen niiden hankintapaikasta.

Omenalajikkeista tehtiin kypsyyshavainnot seuraten OECD:n ohjeita (OECD 2009) omenoiden kypsyysasteen selvittämiseksi lajikkeiden saapuessa tartutettaviksi. Jokaisesta omenalajikenäytteestä havainnoitiin 10 kpl per lajike. Kypsyyshavainnossa mitattiin omenan halkaisija, kiinteys, liukoisten sokerien pitoisuus ja jodivärjäyksellä tärkkelyksen määrä omenassa. Näiden mittausten avulla pystyttiin laskemaan Streifin indeksi lajikekohtaisesti. Omenat otettiin huoneenlämpöön 2 tuntia ennen mittausten tekoa.

7.2.2 Omenoiden kokoluokittelu

Omenan halkaisija mitattiin puisilla sapluunoilla. Kooksi merkattiin sapluunan koko omenan mennessä sen läpi, mutta ei sapluunasta yhtä pienemmän koon läpi. Esimerkiksi jos omena menee 60 mm sapluunasta läpi, mutta ei 55 mm sapluunasta, merkattiin halkaisijaksi 60 mm.

7.2.3 Omenoiden kiinteyden määrittäminen

Omenan kiinteys mitattiin käsipenetrometrillä (Humboldt, Concrete Pocket Penetrometer, Yhdysvallat). Penetrometrin pääksi valittiin yleisesti kovilla hedelmillä käytetty 11,3 mm pää. Omenasta poistettiin kuori höylällä aurinko- ja varjopuolelta, jonka jälkeen kiinteysmittaus voitiin tehdä. Kummaltakin puolelta mitattiin kiinteys painamalla penetrometriä n. 2 sekunnin aikana penetrometrin päässä olevaan merkkiin asti. Molemmilta

puolilta saadut luvut kirjattiin ylös erikseen. Omenoita säilytettiin niiden saapuessa ko-keeseen omenavarastossa ennen mittauksia 3 °C 80–90 RH 1-5 päivää.

Ensimmäisissä kiinteyden mittauksissa lajikkeilla Norland ja Valkealan syys käytettiin 8 mm penetrometripäätä, ennen kuin siirryttiin käyttämään omenoille paremmin sopivaa 11,3 mm mittapäätä.

7.2.4 Omenoiden liukoisten sokerien prosenttiosuuden määrittäminen

Liukoiset sokerit mitattiin omenoista refraktometrillä. Omenan sokeripitoisuus nousee hedelmän kypsyessä, jolloin refraktometrin antamalla brix % lukemalla voidaan seurata hedelmän kypsyttää ja kypsymistä. Saatu brix % kertoo liukoisten sokereiden määrän puristetussa nesteessä. Omenan aurinko- ja varjopuolelta leikattiin lohkot penetrometrimittauskohtien vierestä, lohkoista puristettiin yhdessä mehu, joka kaadettiin mittarille. Refraktometri nollattiin ja puhdistettiin ionisoidulla vedellä omenan vaihtuessa.

7.2.5 Omenoiden tärkkelyspitoisuuden määrittäminen

Joditestia käytetään oikean poiminta-ajankohdan määrittämisessä. Joditestissä värjätään puoliksi leikattu omena leikkauspintaa pitkin ja tarkkaillaan, kuinka väri jakautuu omenassa. Jodi värjää tärkkelyksen sinertäväksi, joten testin tehdessä nähdään omenan tärkkelyspitoisuus.

Omenat halkaistiin keskeltä horisontaalisesti ja verhiöpuoli omenasta säilytettiin. Sen halkaisupinnalle pipetoitiin OECD (2009) ohjeistuksen mukaisesti valmistettua jodiliu-

osta, joka levitettiin sudilla tasaisesti. Jodiliuoksen annettiin vaikuttaa 0,5– 1h, jonka jälkeen halkaisupinnoista otettiin kuvat ja määritettiin värjätyn omenan tärkkelyspitoisuus asteikolla 1–10 (OECD 2009). Tavoitteena oli saada varastokypsiä omenoita tartutuksiin (asteikolla 4–7).

7.2.6 Streifin indeksi

Streifin indeksi kertoo omenoiden fysiologisesta kunnosta ja niiden kypsyysasteesta. Sitä käytetään kertomaan omenoiden optimaalinen sadonkorjuuaika yhdistämällä kolme kypsyyshavainnoinneissa käytettävää mittausmenetelmää. Indeksillä on todistettu olevan riippumaton ilmastosta, omenatarhan sijainnista ja lajikkeesta. Näin se on hyvä indeksi kertomaan omenoiden kypsyysasteesta (Streif 1983, Streif 1996). Streifin indeksi lasketaan kaavalla:

$$\frac{X_{ka}}{Y_{ka} \times Z_{ka}} \quad (1)$$

jossa

X_{ka} = 10 omenan keskiarvoinen kiinteys (kg)

Y_{ka} = 10 omenan keskiarvoinen liukoisten sokerien määrä (brix %)

Z_{ka} = 10 omenan keskiarvoinen tärkkelysindeksi.

Streifin indeksi laskettiin kaikista kokeessa käytetyistä omenalajikkeista ensimmäisten kypsyyshavaintojen perusteella. Havainnot tehtiin 10 kpl/lajike, joista laskettiin keskiarvon mukainen indeksi kuvaamaan omenoiden kypsyystta niiden saapuessa tartutuksiin.

7.3 Omenoiden tartutusmenetelmät

7.3.1 Haavoitustartutukset

Haavoitustartutuksissa mitattiin *Neofabraea* -sienen leviämistä rihmastolla tartutetuissa omenoissa. Haavoitustartutuksissa käytettyjä omenoita pyrittiin tartuttamaan joko 18 kpl isolaatilla T25 tai kaikilla isolaateilla (T21, T25, T42 ja T44) 6 kpl / isolaatti (liite 1). Valetartutuksia tehtiin aina 6 kpl jokaisella tartutuskerralla. Valetartutuksissa käytettiin puhdasta CMA -maljaa tartukkeena. Valittuun tartutustapaan vaikutti sienirihmaston määrä, lajikkeiden saatavuus ja monen lajikkeen kypsyminen samanaikaisesti, jolloin ne piti tartuttaa nopeasti.

Ennen tartutuksia omenoista esipestiin irtolika ionisoidulla vedellä. Tämän jälkeen omenat pintasteriloitiin laminaarikaapissa upottamalla ne 70 -prosenttiseen etanoliin (EtOH) minuutiksi, jonka jälkeen huuhdeltiin EtOH pois upottamalla omenat ddH₂O astiaan minuutiksi. Tämän jälkeen omenat nostettiin Virkon S -desinfiontiaineella (DuPont) pestyihin ja käsipaperilla vuorattuihin muovisiin satolaatikkoihin ja kuivattiin.

Tartutukset tehtiin laminaarikaapissa kontaminaatioiden välttämiseksi. Tartutukset aloitettiin valetartutuksista irrottamalla korkkiporalla ja veitsellä steriilistä CMA -elatusalustasta ohuita kiekkoja. Omenan aurinkopuolelle tehtiin U:n muotoinen tasku skalpellilla, johon pala laitettiin. Taskuun tiputettiin pasteurpipetillä muutama tippa juoksevaa gelatiinia (Difco™) ja suljettiin haava parafilmillä kiertämällä sitä omenan ympäri niin, että haava sulkeutui täysin. Varsinaisia tartutuksia varten sienimaljalta otettu rihmastoa sisältävä agarkiekko laitettiin rihmastopuoli kohti omenaa taskun sisälle, jotta sienen kasvu tapahtuisi kohti omenaa eikä omenan kuorta. Eri sieni-isolaattien välillä välineet steriloitiin 70 -prosenttisella etanolilla desinfioimalla ja liekittämällä. Tartutetut omenat

laitettiin omenakennoihin satolaatikkoihin ja vietiin kylmävarastoon. Parafilmit poistettiin tartutetuista omenoista 7 päivän jälkeen.

7.3.2 Itiötartutukset

Haavoitustartutusten rinnalle haluttiin kehittää luonnossa tapahtuvaa tartuntaa muistuttava menetelmä, joka perustuu tartunnan tapahtumiseen terveeseen omenan korkkihuokosten kautta. Näin saadaan tarkempaa tietoa lajikekohtaisesti omenoiden kestäväyydestä ja kuoren sekä korkkihuokosten rakenteen merkityksestä varastolaikkua aiheuttavista sienistä kohtaan.

7.3.2.1 Itiösuspension valmistus

Vain isolaatit T21 ja T44 saatiin muodostamaan makroitiöitä, joten vain niitä käytettiin itiötartutuksissa. Tavoitteena oli saada itiösuspension pitoisuudeksi 10 itiötä / μl . Valmistusta suspensiota tehtiin vähintään 10 ml tartutuskertaa kohti. Itiöitä huuhdeltiin rihmasto kasvaneilta petrimaljoilta pipetoimalla pasteurpipetillä n. 5 ml 0,05 % Tween 80 (SigmaUltra). Malja laitettiin sekoittumaan orbitaaliseen sekoittajaan (KS250 basic IKA Labrotechnik) n. 15 minuutiksi, jotta itiöitä irtoaisi mahdollisimman paljon suspensioon. Suspensio pipetoitiin pasteurpipetillä koeputkeen ja osa siitä siirrettiin uuteen koeputkeen. Uudessa koeputkessa suspensio laimennettiin 0,05 % Tween 80 :llä läpinäkyväksi ja vorteksoitiin nopeasti (IKA Labrotechnik Janke & Kunkel VF2). Tämän jälkeen otettiin tippa pipetillä hemasytometrille ja laskettiin mikroskoopin avulla itiöiden määrä. Jos itiöitä oli liikaa, laimennettiin suspensiota lisää 0,05 % Tween 80:llä. Jos taas suspensio oli liian laimeata, lisättiin siihen hieman alkuperäistä laimentamatonta suspensiota ja tarkistettiin uudestaan hematosytometrillä suspension pitoisuus.

7.3.2.2 Harsotartutukset

Harsotartutuksissa käytettiin itiösuspensiota tartukkeena.. Sieni-isolaateista tehtiin itiösuspensio 0,05 % Tween 80. Valetartukkeena käytettiin 0,05 % Tween 80:tä.

Harsot leikattiin steriilistä pitkästä harsosta n. 2 cm x 1 cm palasiksi, jonka jälkeen ne steriloitiin uudestaan 50 % etanolissa. Harsot kuivattiin laminaarikaapissa ja niihin pipetoitiin siellä 300 µl itiösuspensiota 12 kpl x T44 + 12 kpl x T21 + 6 kpl x valetartutus jokaiselle itiötartutuksissa käytetylle näyteomenalajikkeelle (liite 1) jokaisen omenan aurinko- ja varjopuolelle. Harsot taiteltiin pinseteillä kahtia ja aseteltiin omenoiden aurinko- sekä varjopuolelle. Harsot kiinnitettiin omeniin parafilmillä. Vuotanut itiösuspensio pyyhittiin omenasta etanoliin kostutetulla käsipaperilla. Tartutetut omenat vietiin omenavarastoon ja 3 viikkoa tartutuksen jälkeen parafilmit sekä harsot poistettiin tartutetuista omenoista.

7.3.2.3 Sumutustartutus

Sumutustartutuksissa on tarkoituksena saada itiöt omena luonnollisesti pisaroiden avulla. Tässä kokeessa käytettiin kynäruiskua (Airbrush Biltema) ja pienoiskompressoria (MC 90 Biltema) tasaisen pienpisarasumun tuottamiseksi. Tartutuksissa käytettiin samalla kertaa valmistettua itiösuspensiota kuin harsotartutuksissa. Tartutuksia tehtiin näyteomenalajikkeista (liite 1) 12 kpl x T44 + 12 kpl x T21 + 6 kpl x valetartutus. Valetartukkeena toimi 0,05 % Tween 80.

Sumutustartutuksissa ruiskutettiin 2 baarin paineella n. 1,5 ml itiösuspensiota omenan varjo- ja aurinkoposken väliin. Kohta merkittiin tussilla. Kynäruisku desinfioitiin 70 %

EtOH ennen tartutuksia ja sieni-isolattien välissä. Mahdollinen ruiskuun jäänyt EtOH huuhdeltiin 0,05 % Tween 80:llä.

Sumutetut omenat laitettiin ionisoidulla vedellä kostutettuihin kennoihin (muutama suihkaus sumutinpullostasta), jotka laitettiin muovisukkaan, jonka päät suljettiin maalarinteipillä kosteuden säilyttämiseksi, mutta kuitenkin niin, että kaasut pääsivät vaihtumaan sukan päädyistä. Omenalaatikot vietiin kylmävarastoon, ja 3 viikkoa tartutuksesta, sukat avattiin kaasujen vaihtumisen parantamiseksi. Sumutustartutetut omenat siirrettiin 20 °C lämpimään varastoon 7 viikkoa tartutuksen jälkeen ja takaisin viileään varastoon 9 viikkoa tartutuksen jälkeen.

7.3.3 Tartutusten havainnointi

Tartutettuja omenoita säilytettiin viileävarastossa, jossa lämpötila oli keskiarvoisesti 3,1 °C sekä ilmankosteus 80–90 %. Tartutusten onnistumisen ja leviämisen havainnointi aloitettiin haavoitus- ja harsotartutetuilla omenoilla 3 viikkoa tartutuksesta. Haavoitus-tartutetuista omenoista mitattiin ensimmäisellä kerralla omenan halkaisija sapluunalla, haava-alueen leveys ja varastolaikun oireen halkaisija horisontaalisesti. Harsotartutetuista omenoista ensimmäiset havainnot tehtiin myös 3 viikkoa tartutuksen jälkeen ja seuraavat havainnot tehtiin 5. vk, 7. vk, 9. vk, 12. vk, 15. vk, 18. vk ja 21. vk varastoinnin jälkeen. Niistä mitattiin omenoiden halkaisija ja laskettiin molemmilta puolilta laikkujen lukumäärä, suurimman laikun horisontaalinen leveys, sairaan alueen halkaisija ja sairaan alueen prosentuaalinen mätämäärä suhteessa sairaan alueen halkaisijaan. Haavoitustartutuksista tehtiin seuraavat havainnot 5. vk, 7. vk, 9. vk, 12. vk, 15. vk, 18. vk varastoinnin jälkeen.

Kesäomenalajikkeilla havainnoinnit lopetettiin 9 viikon varastoinnin jälkeen ja syysomenalajikkeiden 15 viikon varastoinnin jälkeen, sillä niitä ei enää pystynyt havainnoimaan luotettavasti omenoiden alkaessa pehmentyä ja kuoren alkaessa halkeilla. Syys- ja talvilajikkeista jouduttiin poistamaan omenoita kokeesta muumiotaudin ja omenoiden halkeilun vuoksi. Alkuperäinen suunnitelma aurinko- ja varjopuolinen välisten taudin etenemisen vertailusta jätettiin pois, koska tartutukset eivät onnistuneet tarpeeksi usein, jotta näitä kahta olisi voitu vertailla

Sumutustartutettujen omenoiden havainnointi alkoi vasta kahden viikon lämminjakson jälkeen 9 viikkoa tartutuksista. Omenoiden halkaisija mitattiin, laskettiin laikkujen lukumäärä, mitattiin suurimman laikun halkaisija ja arvioitiin sairaan alueen prosentuaalinen osuus omenan pinnasta. Lämminjakson jälkeen sumutustartutetut omenat siirrettiin takaisin viileään omenavarastoon. Samat havainnot tehtiin 9. viikon jälkeen viikoilla 12, 15, 18 ja 20.

7.3.3.1 Area under the disease progress curve

Area under the disease progress curve (AUDPC) on yleisesti käytetty taudin kehittymistä kuvaava arvo, jossa lasketaan taudin etenemistä kuvaavan käyrän muodostaman kuvion pinta-ala. AUDPC-arvo helpottaa havaintoarvojen analysointia, koska näin taudin leviäminen voidaan kuvata yhdellä yksiselitteisellä lukuarvolla. (Campbell ja Madden 1990). Kokeessa laskettiin AUDPC-arvo haavatartutuksissa jokaisesta omenasta Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmalla. Itiötartutuksissa AUDPC-arvot laskettiin vain onnistuneista tartutuksista, jolloin tartutukset jotka eivät onnistuneet jätettiin keskiarvon laskusta kokonaan pois. AUDPC-arvot lasketaan kaavalla:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i) \quad (2)$$

jossa

y_i =näkyvä kuoliolaikku (mm)

t_i =mittausajankohta tartutuksesta (vk).

7.3.3.2 Infektioprosentin laskenta

Infektioprosentti laskettiin Microsoft Excel taulukkolaskentaohjelmalla sieni-isolaateilla tartutetuista omenoista sekä valetartutetuista omenoista erikseen. Valetartutetuista omenoista infektioprosentti kertoo omenalajikkeen näytteissä olevasta piilevästä tartunnasta. Infektioprosentti laskettiin jakamalla kokeessa varastolaikkuja oireilevien omenoiden määrä kaikilla samalla isolaatilla tai valetartutetuilla saman näytelajikkeen omenoiden määrällä.

7.3.3.3 Tilastolliset analyysit

Aineistosta tutkittiin, miten tartutusmenetelmät, sienikannat ja omenalajikkeet vaikuttivat AUDPC-arvolla mitatun mädän etenemiseen havaintojaksojen kuluessa. Eri tekijöiden vaikutusta AUDPC-arvojen erojen tilastolliseen merkitsevyyteen selvitettiin yleisellä lineaarisella mallilla käyttäen Proc Genmod proseduuria (SAS Proprietary Software 9.4 (TS1M4) SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Mallissa selitettävänä muuttujana oli AUDPC-arvo ja selittävinä tekijöinä sienikannat ja omenalajikkeet. Analyysissä käytettiin laskentamenetelmänä suurimman uskottavuuden estimaattia, joka on vähemmän herkkä aineiston jakaumaoletuksille ja virhevarianssin vaihteluille kuin pienimmän neliosumman menetelmät (Stigler 2008). Tilastollisen merkitsevyyden riskitasona pidettiin 95 % ($p < 0,05$) todennäköisyyttä sille, että AUDPC-arvojen ero ei johdu sattumasta.

Pearsonin kaksisuuntaista korrelaatio (r) mittaa kahden tai useamman muuttujan korrelaatiota. Se on muuttujien mittayksiköstä riippumaton ja sen taustaoletuksiin kuuluu

aineiston jatkuvuus, muuttujien välinen lineaarinen yhteys ja että aineisto on lähes normaalisti jakautunut tai normaalisti jakautunut (Sedgwick 2012). Tätä menetelmää käytettiin selvittämään, onko Steifin indeksin ja AUDPC-arvojen välillä tilastollisesti merkitsevää riippuvuutta eli voidaanko Steifin indeksillä ennustaa omenoiden varastolaikusta aiheutuvaa mätänemisherkkyyttä.

Norlandia ja Valkealan syys -lajikkeita ei käytetty korrelaatiota laskettaessa, koska ne eivät olleen verrannollisia muihin lajikkeisiin vaihtuneen kiinteyttä mittaavan pään takia. Norlandia oli myös liian vähän ($n < 10$), jotta indeksi oltaisiin saatu luotettavasti laskettua.

7.4 Sieni-isolaattien DNA perusteinen tunnistus

Sienikannat poikkesivat makroitiöiden ulkomuodon perusteella siiten, että isolaattien T25 ja T42 makroitiöt olivat käyriä ja isolaattien T21 ja T44 suoria. Lajimääritys haluttiin kuitenkin varmistaa lajispesifisillä julkaistuilla DNA-alukkeilla (Bakkeren ym. 2000, Einax ja Voigt 2003, Gariépy ym. 2003, Michalecka ym. 2016).

7.4.1 DNA:n eristys

Sienten DNA eristettiin DNeasy Plant Mini Kitin avulla (Qiagen 2015). Pakkauksen ohjetta muokattiin hieman, sillä DNA:ta saatiin hyvin vähän eristettyä ja näytteissä huomattiin epäpuhtauksia. Rihmastoa kerättiin 50 ng ja puskuri AP1 lämmitettiin ennen käyttöä. Alkuvorteksointi solukon hajottamiseksi pidennettiin 20 sekuntiin ja 7 mm kuulia (Qiagen) laitettiin eppendorf putkeen yhden sijaan kolme. Kohdassa 10 sentrifugausta pidennettiin 10 minuuttiin lyaatin puhdistamiseksi, sekä kohdassa 17 tehtiin

ylimääräinen 2 minuutin sentrifuugaus täydellä teholla (16 200 x g) kolumnin kuivaimiseksi.

Näytteitä yritettiin saada puhtaammiksi hajoittamalla solut vorteksoinnin sijaan jäädyttämällä näyte kuivajäällä ja käyttämällä ne TissueLyserissa (Qiagen) sekä käyttämällä tuoreinäytteitä TissueLyserissa laitteen ohjeiden mukaisesti (Qiagen 2009). Muuten seurattiin Qiagenin miniprotokollan (2015) ohjeita. Näytteiden DNA konsentraatiot mitattiin spektrofotometrillä NanoDrop 2000 (Thermo scientific).

Eristetystä genomisesta DNA:sta tehtiin agarosielektroforeesiajo 0,7 % agarosigeelissä (Agarose I, Thermo scientific), jotta nähtiin onko DNA eristys onnistunut ja onko näyte mahdollisesti hajonnut tai fragmentoitunut. Geeliajo tehtiin elektroforeesilaitteella (Owl scientific plastics, inc, OSP-135, Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis Systems) 40 min 60 V. Kokomarkkerina käytettiin High Range DNA Ladderiä (VWR) ja latauspurkurina 10 x DNA Loading buffer (Omega).

Qiagen (2015) miniprotokollan mukainen sieniperäisen DNA:n eristys ei onnistunut kasvualustoilta, vaikka menetelmää yritettiin muokata eri tavoin: lämmittämällä puskureita, lisäämällä sekoitusaikoja ja jauhamalla näytteet kuivajäädytettynä tissueLyserilla. Eristysten epäonnistuminen huomattiin, kun mitattiin spektrofotometrillä DNA pitoisuuksia eristetyistä näytteistä, sekä kun näytteitä ajettiin geelielektroforeesissa. Näytteiden DNA-pitoisuus oli hyvin alhainen. Lopulta Luonnonvarakeskuksen henkilökunta onnistui eristämään DNA:n kasvualustoilta CTAB (Sethrimoniumbromidi) -menetelmällä Lee ym. (1988) sekä Wu ym. (2001) ohjeiden mukaisesti.

7.4.2 Multiplex PCR

Neofabrea -lajikohtaiset β -tubuliinialukkeiden sekvenssit saatiin Puolassa tehdystä varastolaikun aiheuttajien tunnistuskokeesta (Michalecka ym. 2016) ja aikaisemmasta lajikohtaisesta *Neofabrea* -tunnistuskokeesta multiplex PCR:llä (Gariépy ym. 2003). Kokeessa käytettiin *Neofabrea* -suvun lajit tunnistavia β -tubuliinialukkeita (seqNfTub_F ja seqNfTub_R), lajikekohtaisia multiplexissä käytettäviä β -tubuliinialukkeita (NfTub_F, Neo_alba R, NfTub-262 R, NfTub-382 R ja NfTub-319 R) ja lisäksi universaaleita ITS-alukkeita sienille (Univ ITS F ja Univ ITS R) (taulukko 1).

Taulukko 1. Käytetyt alukkeet ja niiden sekvenssit.

Tunnistaa	Nimi	Sekvenssi	Lähde
<i>N.malicorticis</i>	NfTub-262 R	GACAGCCAACCTTGCGG	Gariépy ym. (2003)
<i>N.perennans</i>	NfTub-382 R	GGGTCGAACATCTGTTGT	Gariépy ym. (2003)
<i>N. kienholzii</i>	NfTub-319 R	TGGTGAGAGGAGCGAAC	Gariépy ym. (2003)
<i>N. alba</i>	Neo_alba3 R	AATATTAGCAGGATATCTCTTCAAG	Michalecka ym. (2016)
Forward aluke	NfTub_F	AACCTTCTCCGTTGTCCCATC	Michalecka ym. (2016)
Universaal ITS	Univ ITS F	GGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC	Bakkeren ym. (2000)
Universaal ITS	Univ ITS R	CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG	Bakkeren ym. (2000)
<i>Neofabrea</i> β -tub.	seqNfTub_F	TGGGCYAAGGGTYAYTAYAC	Einax ja Voigt (2003)
<i>Neofabrea</i> β -tub.	seqNfTub_R	GCCTCAGTRAAYTCCATYTCRTCCAT	Einax ja Voigt (2003)

Eristetyt DNA:t laimennettiin 30 μ l 1 ng / μ l. Valmistettiin kaksi mastermiksiä, josta toiseen tuli yleiset *Neofabrea* β -tubuliinialukkeet (taulukko 2), ja toiseen lajikohtaiset multiplex alukkeet ja universaalit ITS- alukkeet (taulukko 3). PCR-ohjelma 1 x 95 °C 3 min., 30 x 95 °C 30 s., 58 °C 30 s., 72 °C 1 min. ja 1 x 72 °C 5 min.

Taulukko 2. PCR *Neofabraea*- tubuliinialukkeilla. Mastermiksi resepti 11 kertaiseen reaktioon. Puskurina käytettiin 10 x DreamTaq Buffer 20mM MgCl₂ (Thermo scientific), polymeraasina Dream Taq Polymerase 5U/ µL (Thermo scientific) sekä vapaat nukleotidit (Thermo scientific).

Aine	Tavoitekonsentraatio tai -määrä	Stokin konsentraatio	µl/reaktio	11x (µl)
steriili vesi	-		11,875	130,6
Puskuri	1x	10x	2,5	27,5
dNTP		10 mM	2	22
F-aluke seqNfTub_F	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
R-aluke seqNfTub_R	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
DNA-polymeraasi	0,625 u	5 U/µl	0,125	1,4
Templaatti-DNA	(8 ng/reaktio)	5ng/µl	8	88
Lopputilavuus (µl)			25	275

Taulukko 3. Multiplex-PCR mastermixin reseptit 11 kertaiseen reaktioon. Puskurina käytettiin 10 x DreamTaq Buffer 20mM MgCl₂ (Thermo scientific), polymeraasina Dream Taq Polymerase 5U/ µL (Thermo scientific) sekä vapaa nukleotidit (Thermo scientific).

Aine	Tavoitekonsentraatio	Stokin konsentraatio	µl/reaktio	11x (µl)
steriili vesi	-		14,325	157,6
Puskuri	1x	10x	2,5	27,5
dNTP	0,8 mM	10 mM	0,8	8,8
F-aluke NfTub_F	0,4 µM	10 µM	1	11
R-aluke NfTub-262 R	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
R-aluke NfTub-382 R	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
R-aluke NfTub-319 R	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
Univ ITS F-aluke	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
Univ ITS R-aluke	0,1 µM	10 µM	0,25	2,8
DNA-polymeraasi	0,625 u	5 U/µl	0,125	1,4
templaatti-DNA	(5 ng/reaktio)	5 ng/µl	5	55
Lopputilavuus (µl)			25	275

Saadut PCR tuotteet ajettiin geelielektrofreesilaitteella 60 V 40 min. Geeli oli 60 ml 1 x TBE (1,5 % agarosi (Agarose 1, Thermo scientific) ja 3 µl EtBr (Etidiumbromidi, (Pro Lab 2 g, Boehringer Mannheim, Germany)). 8 µl näytteen joukkoon pipetoitiin 2 µl latauspuskuria, minkä jälkeen näytteet pipetoitiin pieniin kelkkoihin. Kokostandardina toimi High Range Ladder (VWR) ja latauspuskurina 10 x DNA loading buffer (Omega).

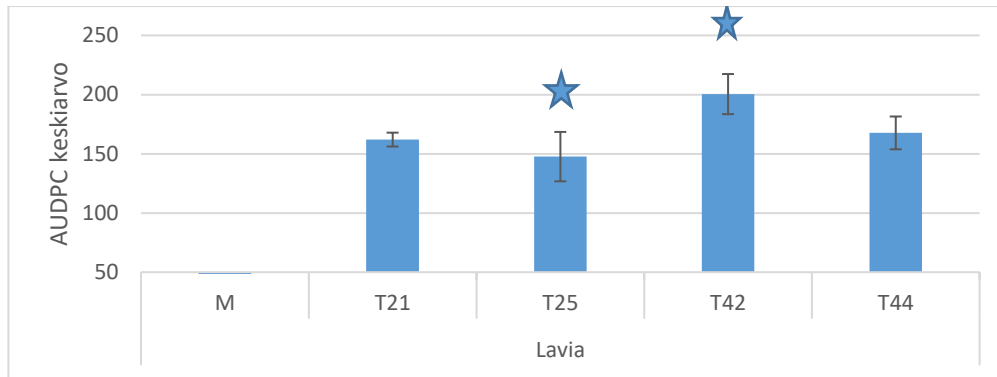
8 TULOKSET

8.1 Haavoitustartutukset

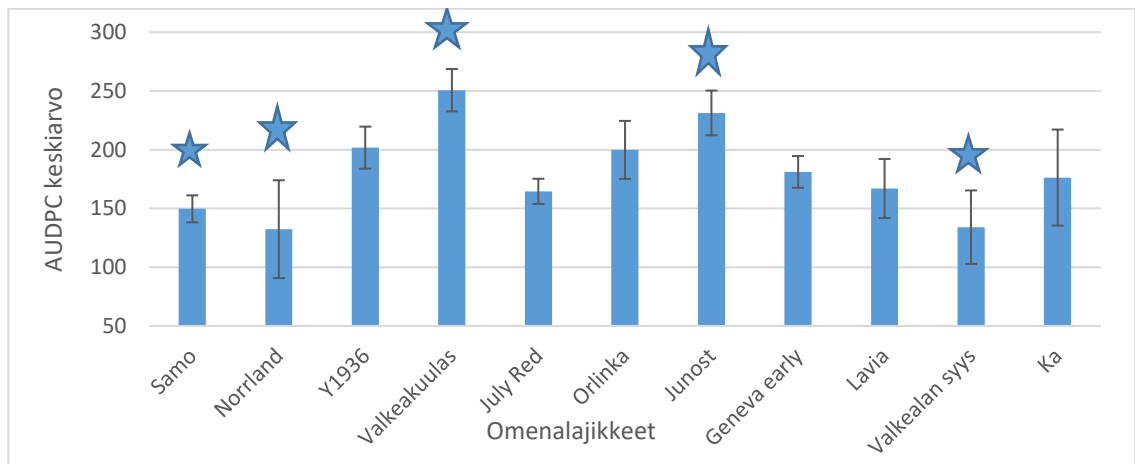
8.1.1 Haavoitustartutukset kesälajikkeilla

Haavoitustartutusten onnistumisprosentti oli kaikilla kesälajikkeilla ja käytetyillä sienisolaateilla 100 % paitsi July Red lajikkeella. July Red lajikkeella kannalla T25 infektioprosentti oli 92 %. Valetartutuksissa ei ollut nähtävissä varastolaikkua millään lajikkeella.

Haavoitustartutuksien AUDPC-arvot laskettiin sairaan alueen leveydestä. Sieni-isolaattien eroa AUDCP-arvojen muodostumisessa tarkasteltiin Lavia lajikkeella (kuva 6) (Liite 2). Sieni-isolaatit T25 ja T42 poikkesivat muista isolaateista ($p < 0,05$). T25- isolaatilla oli alhaisin AUDCP arvo ja T42-isolaatilla korkein AUDCP-arvo. Vertailtiin kesäomenalajikkeiden vaikutusta AUDPC-arvoihin ja huomattiin että $p < 0,05$, eli lajikkeella oli tilastollisesti merkitystä taudin etenemisessä. Kesälajikkeiden eroa tautialttiudelle selvitettiin vertaamalla niitä keskiarvoisimpaan lajikkeeseen Geneva Earlyyn (kuva 7). Huomattiin, että Valkeakuulaksella ja Junostilla oli korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$) eli niiden tautioireiden kehitys oli nopeinta. Samolla, Norlandilla ja Valkealan Syys -lajikkeella oli alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$), eli niiden tautioireiden kehitys oli hitainta.



Kuva 6. Eri käsittelyiden vaikutus AUDPC-arvoihin lajikkeella Lavia. Isolaatit T42 ja T25 poikkesivat muista ($p < 0,05$).

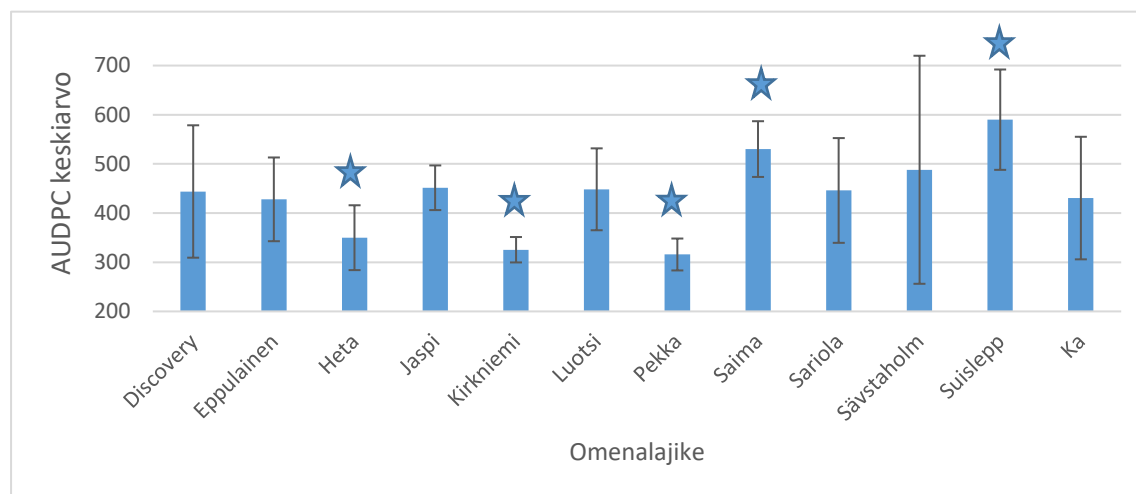


Kuva 7. Kesäomenalajikkeiden AUDPC-arvojen keskiarvot. Tähdellä merkitty merkittävästi ($p < 0,05$) vertailulajikkeesta Geneva Earlystä poikkeavat lajikkeet.

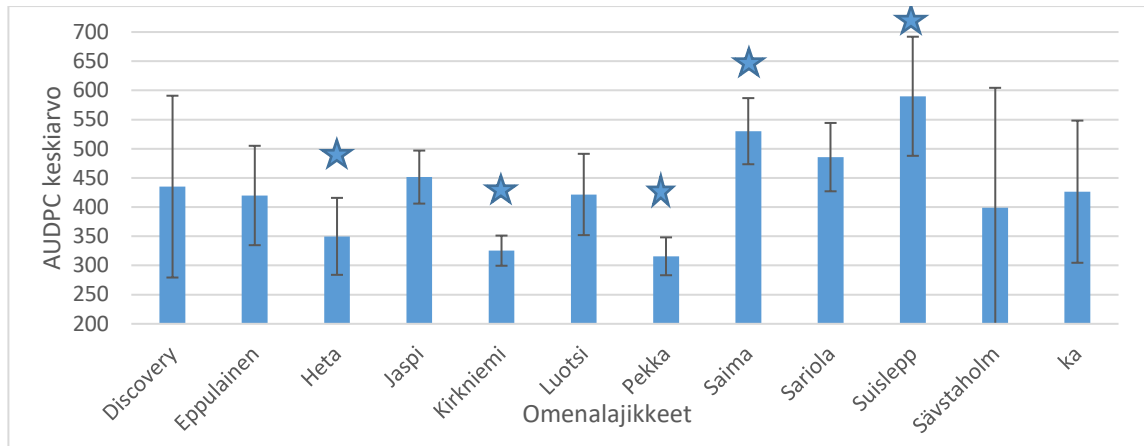
8.1.2. Haavoitustartutukset syyslajikkeilla

Haavoitustartutusten onnistumisprosentti oli lähes kaikilla syyslajikkeilla ja käytetyillä sieni-isolaateilla 100 %. Poikkeuksena Discovery ja Saima (jalostajantunnus Y95151) kannalla T44 tehtyjen tartutusten infektioprosentti oli 50 %. Valetartutetuissa omenoissa spontaania tartuntaa oli Jaspilla sekä Saimalla 17 % ja Discoverylla 13 %.

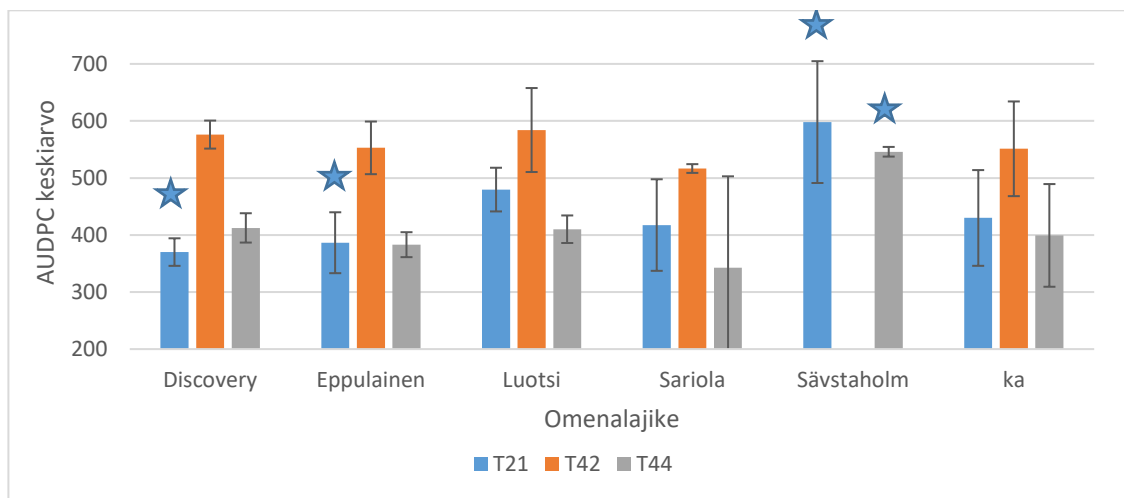
Eri sieni-isolaattikäsittelyillä sekä omenalajikkeilla oli tilastollista merkitsevyyttä AUDPC-arvoihin ($p < 0,05$). Keskiarvoisimmasta lajikkeesta Luotsista poikkeavia AUDPC-arvoja (Liite 2) vertailtiin ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä (Kuva 8) sekä sieni-isolaatit eriteltynä (kuva 9) (kuva 10). Huomattiin, että Hetalla, Kirkniemen Talvella ja Pekalla oli alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Saimalla ja Suislepillä korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Sieni-isolaatilla T25 huomattiin Hetalla, Kirkniemen Talvella ja Pekalla olevan alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$) ja Saimalla sekä Suislepillä korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Isolaatilla T21 Discoveryllä ja Eppulaisella oli alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$) ja Sävstaholm-lajikkeella korkein AUDPC-arvo ($p < 0,05$). Isolaatilla T44 Sävstaholmilla oli korkein AUDPC-arvo ($p < 0,05$). T42-isolaattikäsittelyllä ei ollut tilastollista poikkeavuutta lajikkeiden välillä.



Kuva 8. AUDPC-keskiarvot ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä. Tähdillä merkityt lajikkeet poikkeavat merkitsevästi ($p < 0,05$) vertailulajikkeesta Luotsi.



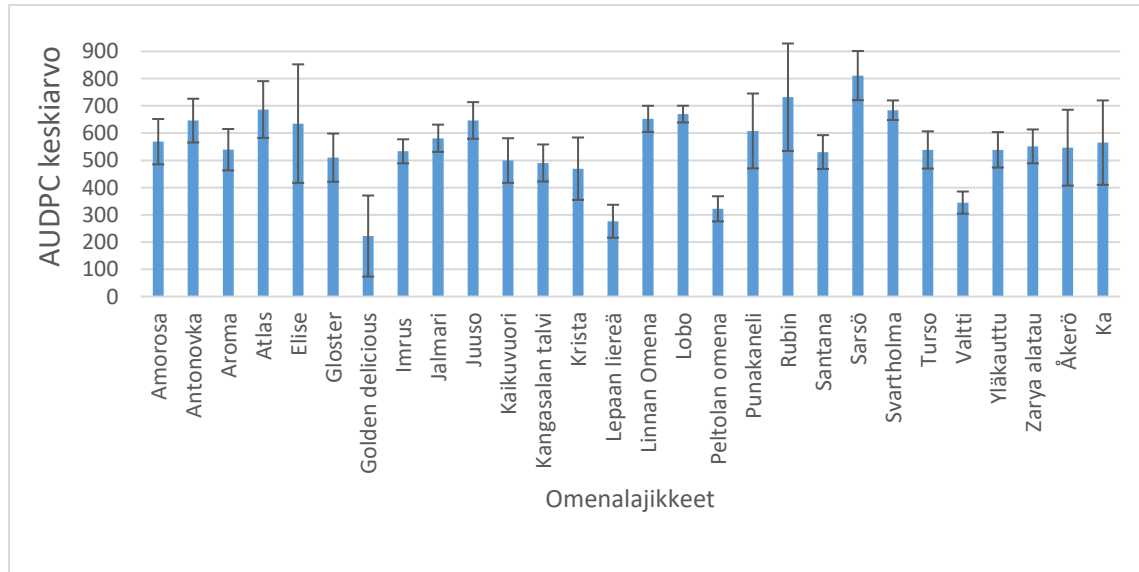
Kuva 9. Sieni-isolaatilla T25 haavoitustartutettujen syysomenalajikkeiden AUDPC-keskiarvo. Tähdillä merkityt lajikkeet poikkeavat merkitsevästi ($p < 0,05$) vertailulajikkeesta Luotsi.



Kuva 10. Sieni-isolaateilla T21, T42 ja T44 haavoitustartutettujen syysomenoiden AUDPC-keskiarvot. Tähdellä merkityt lajikkeet poikkeavat merkitsevästi ($p < 0,05$) vertailulajikkeesta Luotsi.

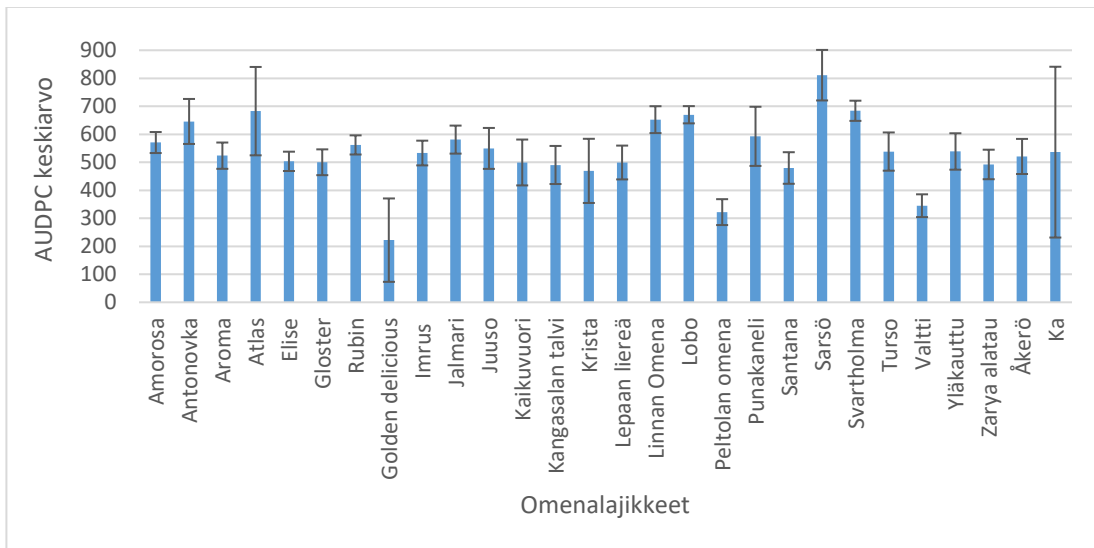
8.1.3 Haavoitustartutukset talvilajikkeilla

Infektioprosentti haavatartutetuilla talvilajikkeilla oli 100 %. Valetartutetuissa omenoissa oli spontaania tartuntaa Linnan Omenassa, Särsössä, Zarya Alataussa ja Amorosassa 17 %, Atlaksessa ja Punakanelissa 33 % ja Aromassa 67 %. Haavoitustartutuksien leviämistä mitattiin tartutuksista 18:sta viikkoon asti, jonka jälkeen laskettiin omenakohtaisesti AUDPC-arvot. Sieni-isolaateilla ja omenalajikkeella oli merkitystä AUDPC-arvoihin ($p < 0,05$). Keskiarvoisimmasta lajikkeesta Åkeröstä poikkeavia AUDPC-arvoja vertailtiin (liite 2) ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä (Kuva 11) ja isolaattikäsittelyt eriteltyinä (kuva 12) (kuva 13). Ilman sieni-isolaattikohtaista vertailua huomattiin, että lajikkeilla Antonovka, Atlas, Elise, Juuso, Linnan Omena, Lobo, Punakaneli, Rubin, Särsö ja Svartholman Talvi oli korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Lajikkeilla Golden Delicious, Lepaan Liereä, Peltolan Omena ja Valtti oli alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).

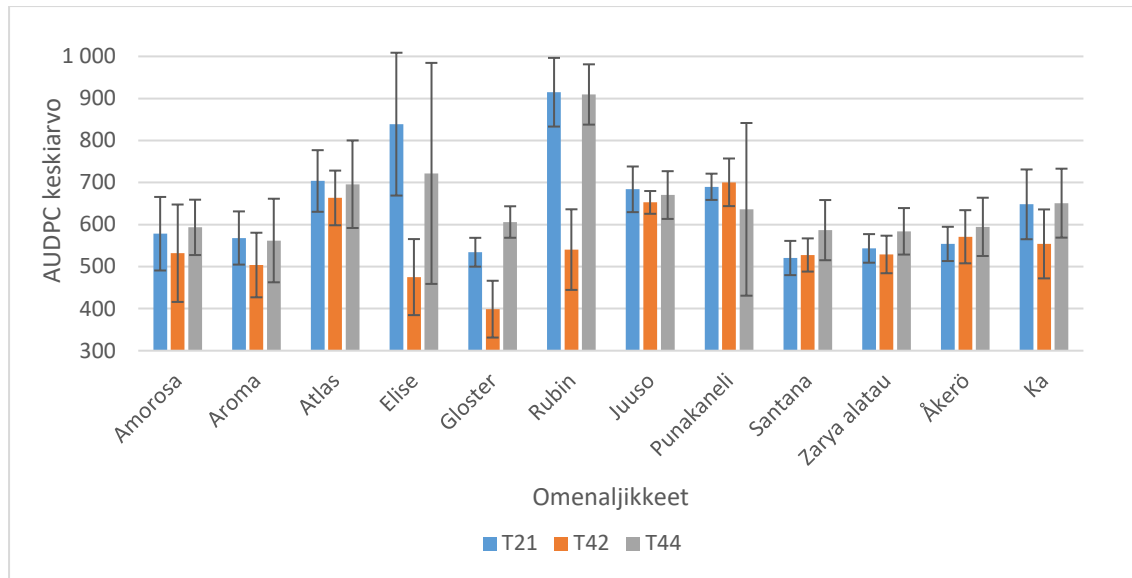


Kuva 11. AUDPC keskiarvot ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä. Lajikkeilla Antonovka, Atlas, Elise, Juuso, Linnan Omena, Lobo, Punakaneli, Rubin, Särsö ja Svartholman Talvi oli korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Lajikkeilla Golden Delicious, Lepaan Liereä, Peltolan Omena ja Valtti oli alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).

Sieni-isolaatilla T25 lajikkeilla Antonovka, Atlas, Lobo, Särsö ja Svartholman Talvi oli merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$) ja lajikkeilla Golden Delicious, Peltolan Omena sekä Valtti oli merkitsevästi alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Sieni-isolaatilla T21 käsitellyistä lajikkeista Atlaksella, Elisellä, Juusolla ja Rubinilla oli merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Sieni-isolaatilla T42 käsitellyistä lajikkeilla Atlaksella ja Punakanelilla oli merkitsevästi korkeimmat ja lajikkeilla Elise sekä Gloster merkitsevästi alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Sieni-isolaatilla T44 käsitellyistä lajikkeista Elisellä ja Rubinilla olivat korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).



Kuva 12. Sieni-isolaatilla T25 haavoitustartutettujen talviomenoiden AUDPC-keskiarvot. Lajikkeilla Antonovka, Atlas, Lobo, Särsö ja Svartholman Talvi oli merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Lajikkeet Golden Delicious, Peltolan Omena sekä Valtti oli merkitsevästi alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).



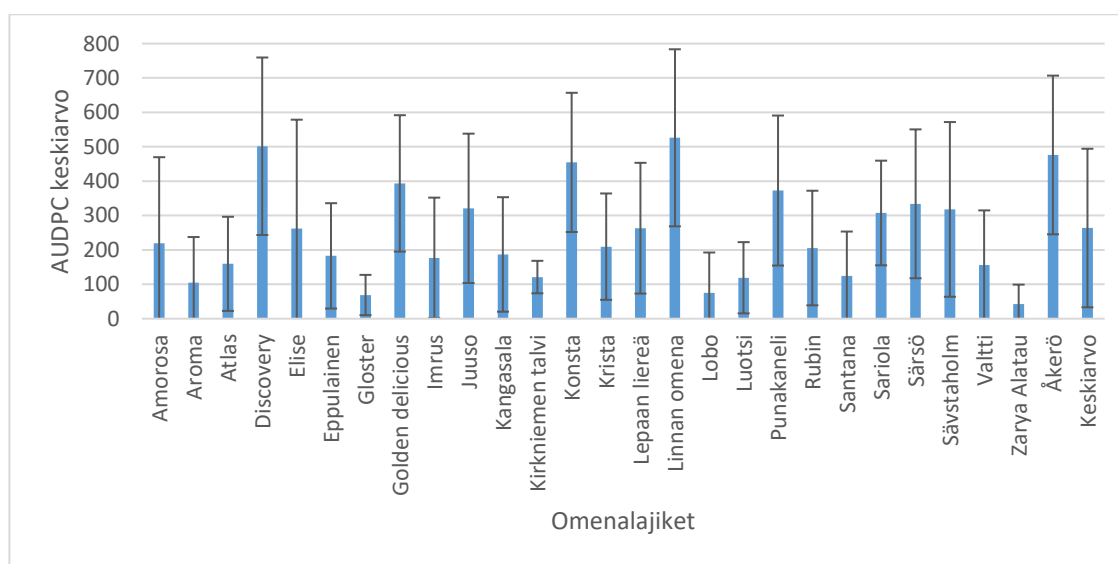
Kuva 13. Sieni-isolaatilla T21, T42 ja T44 haavoitustartutettujen talviomenoiden AUDPC-keskiarvot. Sieni-isolaatilla T21 käsitellyistä lajikkeista Atlaksella, Elisellä, Juusolla ja Rubinilla oli merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Sieni-isolaatilla T42 käsitellyistä lajikkeilla Atlaksella ja Punakanelilla oli merkitsevästi korkeimmat ja lajikkeilla Elise sekä Gloster merkitsevästi alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Sieni-isolaatilla T44 käsitellyistä lajikkeista Elisellä ja Rubinilla olivat merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).

8.2 Itiötartutukset

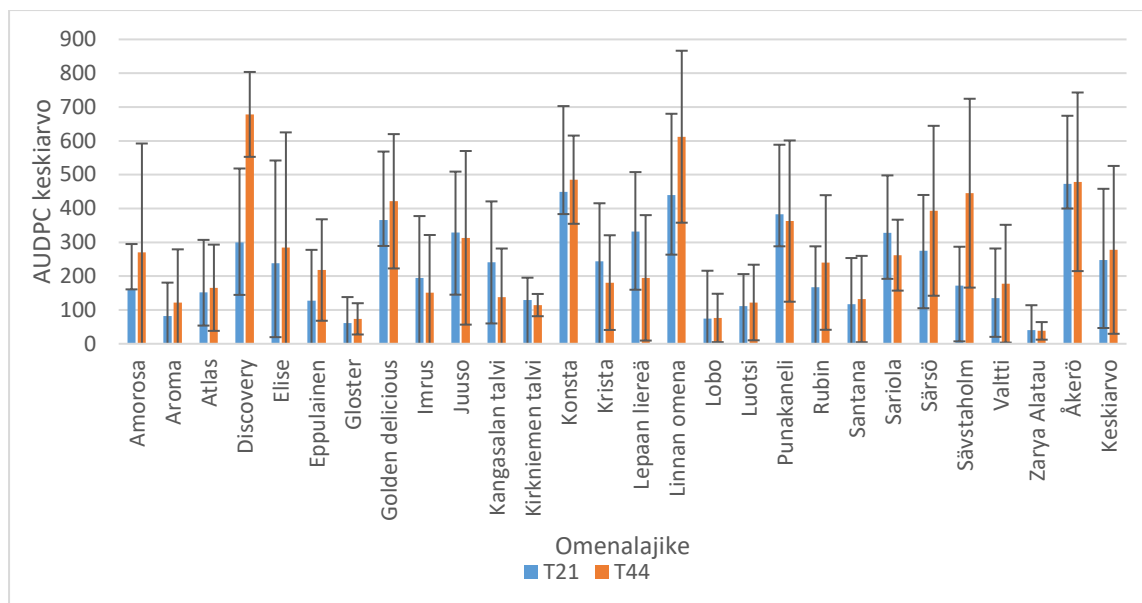
8.2.1 Harsotartutukset

Harsotartutettujen sienien leviämistä mitattiin tartutuksista 21.:seen viikkoon asti, jonka jälkeen saaduista arvoista laskettiin AUDPC-arvot tautia oireilevasta alueesta, jossa oli nähtävissä halkaisijalta yli 2 mm varastolaikkuja. Tartutustuen onnistumisprosentit vaihtelivat 0-100 %:n välillä (liite 3). Sieni-isolaattikäsitteilyllä ja omenalajikkeilla oli merkitsevä varjo- ja aurinkopuolista laskettuihin AUDPC -keskiarvoihin ($p < 0,05$) ja näin ollen taudin etenemiseen. Keskiarvoisimmasta lajikkeesta Lepaan Liereästä poikkeavia

AUDPC-arvoja vertailtiin (liite 2) ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä (Kuva 14) ja iso-laattikäsittelyt eriteltyinä (kuva 15). Ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä huomattiin, että Aroma, Gloster, Lobo, Luotsi, Santana, Valtti ja Zarya Alatau lajikkeilla oli alhaisimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot ja, että lajikkeilla Discovery, Golden Delicious, Konsta, Linnan Omena ja Punakaneli oli korkeimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot. Sieni-isolaatilla T21 käsitellyistä lajikkeista korkeimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot olivat lajikkeilla Amorosa, Aroma, Atlas, Eppulainen, Gloster, Imrus, Kirkniemen Talvi, Lobo, Luotsi, Rubin, Santana, Sävstaholm, Valtti, Zarya Alatau ja Åkerö. Isolaatilla T44 käsitellyistä lajikkeista korkeimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot olivat lajikkeilla Discovery, Golden Delicious, Konsta, Linnan omena, Punakaneli, Särso, Sävstaholm ja Åkerö.



Kuva 14. AUDPC-keskiarvot ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä. Lajikkeilla Aroma, Gloster, Lobo, Luotsi, Santana, Valtti ja Zarya Alatau oli merkitsevästi alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Lajikkeilla Discovery, Golden Delicious, Konsta, Linnan Omena ja Punakaneli oli merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).

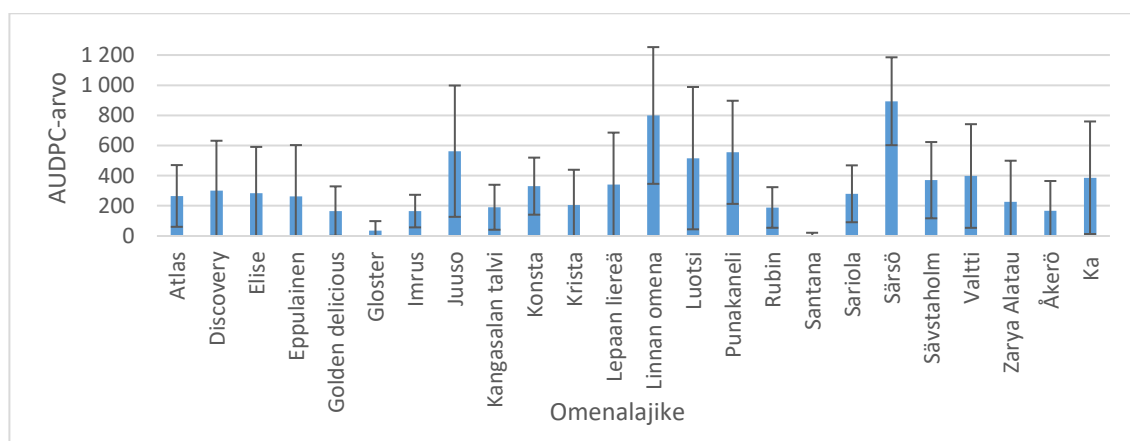


Kuva 15. AUDPC-keskiarvot sieni-isolaattikohtaisesti eriteltyinä. Sieni-isolaatilla T21 käsitellyistä lajikkeista merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot olivat lajikkeilla Amorosa, Aroma, Atlas, Eppulainen, Gloster, Imrus, Kirkniemen talvi, Lobo, Luotsi, Rubin, Santana, Sävsstaholm, Valtti, Zarya Alatau ja Åkerö ($p < 0,05$). Isolaatilla T44 käsitellyistä lajikkeista merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot olivat lajikkeilla Discovery, Golden Delicious, Konsta, Linnan omena, Punakaneli, Särsö, Sävsstaholm ja Åkerö ($p < 0,05$).

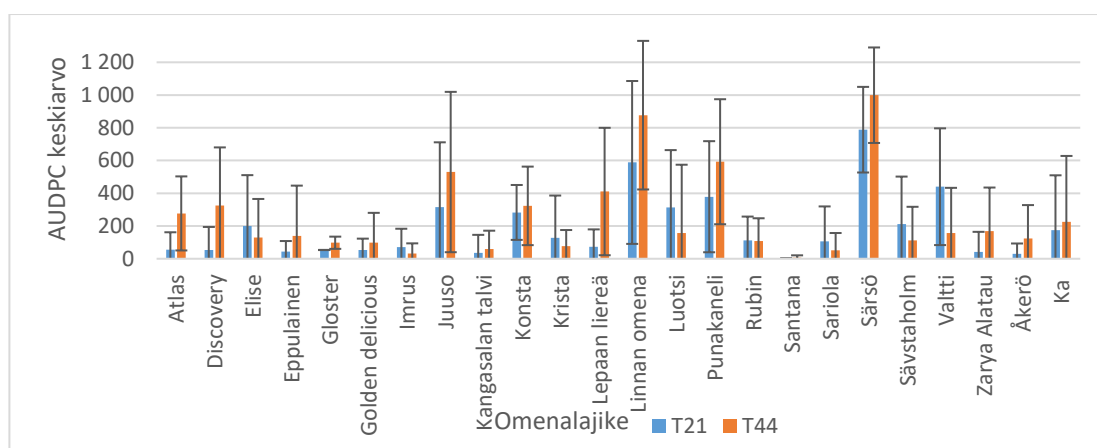
8.2.2 Sumutustartutukset

Sumutustartutusten leviämistä mitattiin tartutuksista 20:n viikkoon asti, jonka jälkeen laskettiin omenakohtaisesti AUDPC- arvot (liite 2). Lajikkeiden infektioprosentit vaihtelivat sumutustartutuksissa 0–100 %:n välillä, samoin kuin valetartutettujen omenoiden spontaanitartunta (Liite 3). Sieni-isolaattikäsittelyllä ja omenalajikkeilla oli merkitystä AUDPC -arvoihin ($p < 0,05$). Keskiarvoisimmasta lajikkeesta Sävsstaholmista poikkeavia AUDPC-arvoja vertailtiin ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä (Kuva 16) ja isolaattikäsittelyt eriteltyinä (kuva 17). Ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä lajikkeilla Gloster ja Santana oli alhaisimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot ja lajikkeilla Juuso, Linnan

omena, Punakaneli ja Särsö oli korkeimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot. Isolaatilla T21 käsitellyistä lajikkeista Linnan Omenalla ja Särsöllä oli korkeimmat ($p < 0,05$) ja Santanalla sekä Valtilla oli matalimmat ($p < 0,05$) AUDPC-arvot. Isolaatilla T44 käsitellyistä lajikkeista korkeimmat ($p < 0,05$) arvot olivat Juusolla, Lepaan Liereällä, Linnan Omenalla, Punakanelilla ja Särsöllä.



Kuva 16. AUDPC-keskiarvot ilman sieni-isolaattikohtaista erittelyä. Lajikkeilla Gloster ja Santana oli merkitsevästi alhaisimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Lajikkeilla Juuso, Linnan omena, Punakaneli ja Särsö oli merkitsevästi korkeimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$).



Kuva 17. AUDPC-keskiarvot isolaattikäsitteyt eriteltyinä. Isolaatilla T21 käsitellyistä lajikkeista Linnan Omenalla ja Särsöllä oli merkitsevästi korkeimmat ja Santanalla sekä Valtilla

oli merkitsevästi matalimmat AUDPC-arvot ($p < 0,05$). Isolaatilla T44 käsitellyistä lajikkeista merkitsevästi korkeimmat arvot olivat Juusolla, Lepaan Liereällä, Linnan Omenalla, Punakanelilla ja Särsöllä ($p < 0,05$).

8.3 Streifin indeksin vertailu

Streifin indeksien (taulukko 4) (taulukko 5) (taulukko 6) ja eri menetelmien välisten AUDPC-arvojen Pearsonin korrelaatiokertoimet olivat $p > 0,05$, joten AUDPC-arvojen ja Streifin indeksin välille ei saatu todistusta riippuvuudesta.

Taulukko 4. Lasketut Streifin indeksit kesälajikkeilla.

Omenalajike	Streifin indeksi
July Red	0,053
Junost	0,061
Lavia	0,573
Norland	0,0679
Orlinka	0,072
Samo	0,088
Y1936	0,027
Valkeakuulas	0,061
Geneva Early	0,038
Valkealan Syys	0,1209

Taulukko 5. Lasketut Streifin indeksit syyslajikkeilla.

Omenalajike	Streifin indeksi
Discovery	0,1365
Eppulainen	0,1165
Heta	0,0859
Jaspi	0,0931
Kirkniemen Talvi	0,4866
Luotsi	0,4515
Pekka	0,1228
Saima	0,0217
Sariola	0,0961

Suislepp	0,0834
Sävstaholm	0,0428

Taulukko 6. Lasketut Streifin indeksit talvilajikkeilla.

Omenalajike	Streifin indeksi
Amorosa	0,138
Antonovka	0,101
Aroma	0,137
Atlas	0,088
Elise	0,063
Gloster	0,466
Golden Delicious	0,075
Imrus	0,191
Jalmari	0,125
Juuso	0,095
Kaikuvuori	0,216
Kangasalan Talvi	0,083
Krista	0,132
Lepaan Liereä	0,089
Linnan Omena	0,109
Lobo	0,102
Peltolan Omena	0,094
Punakaneli	0,062
Rubin	0,099
Santana	0,2
Svartholman Talvi	0,108
Särsö	0,073
Turso	0,134
Valtti	0,078
Yläkauttu	0,073
Åkerö	0,514

8.4 Sieni-isolaatit

8.4.1 Sieni-isolaattien DNA-perusteinen tunnistus

Lajispesifisten tunnistusten mukaan isolaateissa T21, T25, T42 ja T44 oli kaksi eri sienilajia, jotka aiheuttavat varastolaikkua omenalla. Isolaatit T21 ja T44 olivat *N. perennans*- ja isolaatit T25 ja T42 olivat *N. alba*- lajia.

8.4.2. Sieni-isolaattien taudinaiheutuskyvyn ero

Haavoitustartutuksia tarkastellessa huomattiin syylijikkeilla *N. alba* -lajin olevan virulentimpi varastolaikun aiheuttaja kun *N. perennans* -lajin (kuva 9) (kuva 10). Talvilajikkeilla taas *N. perennans* oli virulentimpi laji kuin *N. alba* (kuva 12) (kuva 13). Itiötartutuksissa käytetyt isolaatit olivat samaa *Neofabraea* -lajia, joten lajien taudinaiheutuskykyä ei voida vertailla itiötartutuskokeissa.

8.5. Yhteenveto tartutustuloksista

Suomalaisten omenalajikkeiden lajikekohtaisesta vertailusta varastolaikkualttiudelle saatiin selkeät tulokset altteimmista ja kestävimmistä lajikkeista (taulukko 7). Tartutusmenetelmien välillä saaduissa tuloksissa oli silti eroja. Koska sumutustartutuksia tehtiin vain isolaateilla T21 ja T44, ja ne tunnistettiin myöhemmin samaksi lajiksi *N. perennans*, voidaan tarkastella sumutustartutuksien tuloksia ilman isolaattikohtaista vertailua haavoitustartutusten tuloksiin. Sumutustartutuksissa kestävimvät lajikkeet Gloster ja Santana eivät olleet haavoitustartutuksissa kestävimpien lajikkeiden joukossa isolaateilla T21 ja T44, mutta isolaatilla T42 Gloster oli myös haavoitustartutuksissa kestävimpien näytelajikkeiden joukossa. Sumutustartutuksissa AUDPC-arvojen voidaan ajatella kertovan lajikkeen taudinaiheuttajan kestävydestä, sillä tartunta tapahtui itiöiden avulla

korkkihuokosten kautta ehjässä omenassa, kuten luonnossa tapahtuva varastolaikkutartunta.

Taulukko 7. Tartutusmenetelmien yhteenveto lajikkeittain ja tartutuskokeen tuloksista tehtyt varastolaikun kestävyyttä tai alttiutta koskevat johtopäätökset.

Lajike	Lajiketyyppi	Varastolaikun kestävyys		Tartutusmenetelmä	
		Altis	Kestävä	Haavoitustartutus	Sumutus-tartutus
Valkeakuulas	Kesälajike	x		x	
Junost	Kesälajike	x		x	
Samo	Kesälajike		x	x	
Norland	Kesälajike		x	x	
Valkealan Syys	Kesälajike		x	x	
Heta	Syyslajike		x	x	
Kirkniemen Talvi	Syyslajike		x	x	
Pekka	Syyslajike		x	x	
Saima	Syyslajike	x		x	
Suislepp	Syyslajike	x		x	
Antonovka	Talvilajike	x		x	
Atlas	Talvilajike	x		x	
Elise	Talvilajike	x		x	
Juuso	Talvilajike	x		x	x
Linnan Omena	Talvilajike	x		x	x
Lobo	Talvilajike	x		x	
Punakaneli	Talvilajike	x		x	x
Rubin	Talvilajike	x		x	
Särsö	Talvilajike	x		x	x
Svartholman Talvi	Talvilajike	x		x	
Golden Delicious	Talvilajike		x	x	
Lepaan Liereä	Talvilajike		x	x	
Peltolan Omena	Talvilajike		x	x	
Valtti	Talvilajike		x	x	
Gloster	Talvilajike		x		x
Santana	Talvilajike		x		x

Eri tartutusmenetelmien tulosten välillä oli enemmän yhtäläisyyksiä korkeiden AUDPC-arvoisten lajikkeiden välillä. Linnan Omena ja Punakaneli olivat altteimpia lajikkeita sumutustartutuksissa ja tautioireet etenivät nopeinten niillä haavoitustartutuksissa ilman sienilajikohtaista erottelua. Juusolla tautioireet levisivät nopeinten sekä haavoitustartutuksissa, että sumutustartutuksissa ilman sienilajikohtaista erottelua ja haavoitustartutuksissa isolaatilla T21.

Syyslajikkeiden haavatartutusten AUDPC-arvot laskettiin viikkoon 15 asti tehdyistä havainnoista, kun taas talvilajikkeiden haavatartutusten havainnot laskettiin viimeisistä 18 asti tehdyistä havainnoista, joten niiden AUDPC-arvoja ei voida suoraan vertailla keskenään. Syyslajikkeiden haavoitustartutuksissa ja sumutustartutuksissa ei ollut tilastollisia yhtäläisyyksiä.

9 TULOSTEN TARKASTELU

9.1 Tartutustulokset

Varastolaikkukokeesta saatiin selkeitä tuloksia lajikkeista, joissa tauti oireet etenevät nopeammin tai hitaammin kuin vertailulajikkeissa. *Penicillium* sp. aiheuttaman omenanhomeaudin tutkimuksessa on saatu varastolaikun haavoitustartutustuloksien tukevia tuloksia (Tahir ym. 2015). Kyseisessä tutkimuksessa *P. expansum* -itiösuspensiolla haavatartutettujen omenalajikkeissa sairastuneen alueen laikun kasvu oli suurinta varastolaikkukokeessakin käytetyillä koelajikkeilla Juusolla, Sariolalla, Konstalla, Discoverylla, Santanalla ja Rubinilla. Tahir ym. (2015) tulokset tukevat tuloksiamme Juuson ja Rubinin alttiudesta varastolaikulle haavoitustartutuksissa. Toisaalta Tahir ym (2015) tuloksissa Santana oli varastolaikulle altis lajike, mikä poikkeaa saamistamme itiötartutustuloksista. Varastolaikkukokeemme itiötartutustulosten mukaan Santana on varastolaikulle varsin

kestävä lajike. Erot Santana lajikkeen tuloksissa selittyvät mitä todennäköisimmin tartutusmenetelmien eroilla.

Hortova ym (2014) huomasivat omenoiden *Neofabraea* -haavoitustartutuskokeessa Rubin -lajikkeen olevan selkeästi alttein taudin etenemiselle omenassa, verrattaessa muhin kokeessa käytettyihin lajikkeisiin. Tämä tukee tutkielman talviomenalajikkeilla tehtyjä haavoituskokeita, joissa huomattiin Rubinin olevan varastolaikulle altteimpia näytelajikkeita.

Itiötartutuksissa kaksi lajiketta oli selvästi kestävämpiä kuin muut kokeessa käytetyt lajikkeet. Kestävimmät lajikkeet Gloster ja Santana ovat molemmat punaisia hyvin varastointia kestäviä talviomenalajikkeita. Ne ovat eteläisimmän Suomen lajikkeita, sillä ne kypsyvät vain la -vyöhykkeellä saatavan riittävän suuren lämpösumman avulla. Punaisesta väristä voidaan päätellä kuoren sisältävän paljon entsyymitoimintaa, ja näin myös haitallisia aineita taudinaiheuttajille (Lata 2007). Li ym. (2014) huomasivat, että Red Fuji-omenalajikkeen kuoren antioksidanttipitoisuudet laskivat vain 8,6 % 60:n varastointipäivän aikana ja 18,5 % 90:n varastointipäivän aikana. Koska korkea antioksidanttipitoisuus suojaaa omenaa omenatarhassa, tästä voidaan päätellä, että kuoren antioksidantit suojaavat omenaa varastoinninkin aikana. Toisinsanottuna lajikkeet, joilla on korkeat antioksidanttipitoisuudet kuoressa pystyvät suojautumaan omenatarhassa sekä -varastossa taudinaiheuttajilta paremmin, kuin lajikkeet joilla on alhainen antioksidanttipitoisuus kuoressa. Kuoren väriä ei silti voida pitää suorana indikaattorina tautikestävyydelle, sillä tautikestävyyteen vaikuttavat monet muutkin tekijät.

Myös korkkihuokosten rakenne kuoressa vaikuttaa itiöiden potentiaaliin päästä tartuttamaan omenaa (Verhoeff 1974). Rakenteet vaihtelevat eri lajikkeilla, mikä vaikuttaa lajikkeiden varastolaikkukestävyyteen. Tutkimusta erivärisillä omenoilla, niiden kuoren

entsyymitoiminnasta, taudin etenemisen nopeudesta ja korkkihuokosten rakenteesta tarvitaan lisää ennen kuin voidaan vetää suoria johtopäätöksiä kuoren värin merkityksestä tautien kestävyYTEEN.

9.1.1 Valetartutettujen omenoiden Infektioprosentin merkitys tuloksiin sumutustartutetuissa näyteomenoissa

Punakaneli- ja Linnan Omena- lajikkeissa valetartutetuissa omenoissa oli paljon spontaania omenatarhalta saatua *Neofabraea* tartuntaa. Punakanelit tulivat Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan lajikenäytetarhasta ja Linnan omena Akaalla sijaitsevalta luomumenatarhalta. Kummassakaan omenatarhassa ei käytetä kemiallista torjuntaa. Varastolaikkua esiintyy useimmissa omenatarhoissa, mutta kemiallisten torjunta-aineiden käytön todettu alentavan tautioireiden ilmentymistä varastossa (Cameldi ym. 2016). Tarhojen kasvinsuojelukäytännöt ovat siis mitä todennäköisimmin vaikuttaneet kyseisten lajikkeiden tuloksiin muokaten lajikkeiden koetuloksia saaden ne vaikuttamaan alttiimmilta, kun kyseiset lajikkeet todellisuudessa ovat.

9.1.2 Eri tartutusmenetelmien tulosten eroavaisuudet

Kokeessa eri menetelmillä saadut erilaiset alttiustulokset johtuvat mitä todennäköisimmin kuoren fyysisen suojan ohittamisesta haavoitusmenetelmällä. Ehjällä omenalla on fyysisen esteen lisäksi enemmän aikaa tunnistaa taudinaiheuttaja ja estää taudin eteneminen. Kasvien puolustusjärjestelmän elisiittorit tunnistavat mahdollisen taudinaiheuttajan ja alkavat tuottamaan taudinaiheuttajille haitallisia yhdisteitä, kun ne tunnistavat mahdollisen taudinaiheuttajan (Ippolito ym. 2000). Haavoitettu omena menettää aikaa taudinaiheuttajan hyökkäyksen ollessa jo hedelmäsolukossa haavoitustartutuksissa, ennen kuin omena pystyy vastaamaan hyökkäykseen tuottamaan puolustukseen käytettäviä entsyymejä ja fyysisiä esteitä, kuten vahvistamaan soluseiniä (Jha ym. 2009).

Wang ym. (2016) todistivat, että rihmaston ikä vaikuttaa taudinaiheutuskykyyn *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary -sienellä. Käyttämämme *Neofabraea* -rihmastot olivat eri-ikäisiä vaihdellen muutamasta viikosta kuukauteen. Tämä on voinut vaikuttaa haavoitus-tartutuksissa sieni-isolaattien taudinaiheutuskykyyn ja näin tuonut mahdollisia virheitä haavoitustuloksiin.

Sumutustartutuksissa ja haavoitustartutuksissa kokeen aikana ylikypsentyneet ja muu-miotautiin sairastuneet omenat poistettiin kokeesta, sillä niistä ei voitu mitata laikun le-viämistä luotettavasti. Jos lajiketta on käsittelyssä tämän jälkeen liian vähän, sitä ei ole voitu ottaa mukaan tilastolliseen laskentaan. Esimerkiksi Kirkniemen Talvea ei ole voitu ottaa sumutustartutuksissa huomioon, sillä omenoita oli jäljellä T44-siolaatilla tartute-tuista 4 kpl.

Harsotartutuksien tulokset eivät ole täysin luotettavia, mutta niitä voidaan pitää suun-taa-antavina. Valitettavasti kakki harsopalat eivät olleet täysin kuivunet etanolilla desin-fioinnin jälkeen, jolloin on todennäköistä, että kosteisiin harsoihin pipetoidut itiöt kuoli-vat. Tästä syystä harsotartutuksissa oli nähtävissä paljon nollatuloksia. Laskennassa on käytetty vain omenoita, joihin on muodostunut varastolaikkua. Tämä vääristää tuloksia, sillä välttämättä kaikki nollatulokset eivät ole syntyneet koeteknisistä syistä, vaan näy-teomenat ovat voineet pystyä hidastamaan taudin etenemisen niin, ettei tautioiretta ole ollut vielä näkyvissä. Tämä tarkoittaa sitä, että lajikkeet vaikuttavat laskennallisesti alt-tiimmilta varastolaikulle kuin mitä ne todellisuudessa ovat. Jotta saataisiin luonnossa ta-pahtuvaa tartuntaa muistuttavaa *Neofabraea* -sienten tartuntaa aikaiseksi ja todellisia lajikkeiden eroja vertailtua, tulee koetta toistaa.

9.2 Streifin indeksin vaikutus varastolaikun oireiden etenemiseen

Laskettujen Streifin indeksien ja AUDPC-arvojen välillä ei ole korrelaatiota, eli omenoiden sadonkorjuu ajankohdalla ja varastolaikun oireiden etenemisellä ei ole yhteyttä. Nyt saatuja tuloksia vastoin aikaisemmissa tutkimuksissa kypsempien omenien on todettu olevan alttiimpia varastolaikulle (Ahmadi-Afzadi ym. 2013, Børve ym 2013, Cameldi ym. 2016). Cameldi ym. (2016) käyttivät tutkimuksessaan yhtä näyteomenalajiketta kahdesta omenatarhasta ja neljää eri sadonkorjuuajankohtaa. Heillä oli siis käytössään neljä eri kypsyysastetta samasta omenalajikenäytteestä. Tämä selittää tutkimustulosten välistä eroa. Tutkielman varastolaikkututkimuksessa ei ollut resursseja vertailla eri ajankohtina kerättyjen saman näyteomenalajikkeen AUDPC-arvoja ja Streifin indeksejä, vaan vertailimme kaikkien näyteomenalajikkeiden Streifin indeksia yhdellä tartutusajankohdalla ja niistä saatujen AUDPC-arvojen ja Streifin indeksin korrelaatiota. Cameldi ym. (2016) tutkimus on tätä vuorovaikutusta tutkiessa tarkempi menetelmä ja antaa luotettavan tuloksen AUDPC-arvon ja kypsyysasteen välisestä korrelaatiosta.

Tulevissa varastolaikkututkimuksissa olisi tärkeää toistaa Cameldi ym. (2016) kaltainen koe muutamalla näyteomenalajikkeella, jotta voidaan tehdä yhteneväisiä johtopäätöksiä varastolaikun oireiden etenemisestä ja kypsyysasteen korrelaatiosta.

9.3 Sienilajien eroavaisuudet

Haavoitustartutuksia tarkastellessa huomattiin syylijikkeilla *N. alba* -lajin olevan virulentimpi varastolaikun aiheuttaja kuin *N. perennans* -lajin. Talvilajikkeilla taas *N. perennans* oli virulentimpi laji kuin *N. alba*. *N. alba* -lajia pidetään yleisesti heikompana taudinaiheuttajana kuin *N. perennans* -lajia, sillä *N. alba* voi elää puussa saprofyyttinä, kun taas *N. perennans* muodostaa aina koroja (Verkely 1999). Henriquez ym. (2006) huomasivat,

että *N. alba* -sienellä tartutetut puut tuottavat pienempiä koroja kun *N. perennans* -sienellä tartutetut puut. Hortova ym. (2014) huomasivat, että vaikka *N. alba* - ja *N. perennans* -lajeilla on eroa koron muodostuksen aiheutuskyvyllä, niin hedelmän varastolaikun muodostuksessa lajien sisäinen vaihtelu oli yhtä suurta, kuin lajien välinen vaihtelu. Hortovan ym. (2014) tutkimus toteutettiin haavoitusmenetelmällä, joten itiösuspensiolla tehdyistä menetelmistä ei tiedetä lajien välistä eroa taudinaiheuttamiskyvyssä.

Virulenssin vaihtelu lajin sisällä selittää isolaattien välillä olevia eroja AUDPC -arvoissa kummallakin tartutusmenetelmällä. Toisaalta haavoitustartutuksissa heikosti kontrolloituja muuttujia ovat myös rihmaston ikä, tartutuspaan sattuneen rihmaston määrä ja onko rihmasto otettu kasvuston ulkoreunalta vai keskemältä. Ne voivat selittää vaihtelua isolaattien T21 ja T44 sekä T25 ja T42 välillä.

Sumutustartutuksissa AUDPC -arvoihin on voinut vaikuttaa itiösuspension määrän vaihtelu. 1,5 ml itiösuspensiota suihkutettiin mittaamalla 2 baarin paineella, kuinka kauan suihkua tulee pitää päällä. Ruiskun suihkuttamisen pituus on todennäköisesti vaihdellut ainakin hieman inhimillisen reaktiokyvyn takia, mutta pienikin ero voi aiheuttaa suurta vaihtelua itiöiden määrässä eri näyteominoissa.

Valitettavasti *N. alba* -lajia ei saatu tuottamaan makroitiöitä, vaikka itiöiden tuottamista yritettiin indusoida käyttämällä kasvualustoina CMA ja PDA maljojen lisäksi MEA (malasagar) (Lab M, Neogen company) ja 1,5% vesiagar (HiMedia laboratories). Näin ollen erilajien itiöiden taudinaiheutuskykyä ei voida vertailla. Cameldi ym. (2017) tutkivat itiöiden muodostumisen indusoitumista ja huomasivat *N. alba* -sienellä itiöiden muodostukseen optimilämpötilan olevan 0–15 °C. Parhaana kasvualustana samassa tutkimuksessa todettiin olevan tomaattiagar (TA), jossa oli 500 g kaupallista tomaattipyreetä, 15 g agar (Oxoid agar technical) ja 500 ml tislattua vettä. Jatkotutkimuksissa pitäisi siis

käyttää kyseistä TA kasvualustaa ja pitää kasvustot viileäkaapissa huoneenlämmön sijaan, jotta saataisiin muodostettua *N. alba* itiöitä.

10 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tutkielman tavoitteena oli vertailla Suomessa viljeltyjen omenalajikkeiden kestävyyttä *Neofabraea* spp. aiheuttamalle varastolaikulle. Haluttiin myös selvittää lajispesifisti mitä taudinaiheuttajia kokeessa oli käytössä. Lajikkeiden kestävyydestä voidaan tehdä suuntaa-antavia johtopäätöksiä, mutta luotettavien tulosten saamiseksi kestävimmistä ja altteimmista lajikkeista, täytyy itiötartutusmenetelmiin perustuvia kokeita toistaa.

DNA -perusteisesti tunnistettiin kaksi taudinaiheuttajalajia: *Neofabraea alba* ja *Neofabraea perennans*. Valitettavasti näiden kahden lajin välisten varastolaikku taudinaiheutuskyvyn eroista ei saatu luotettavia tuloksia, mutta tehdyssä tutkimuksessa saatiin paljon arvokasta tietoa *N. alba* - ja *N. perennans* -lajien käyttäytymisestä laboratorio-olosuhteissa. Näitä tietoja pystytään hyödyntämään kyseisten sienten jatkotutkimuksissa.

Kaiken kaikkiaan Suomessa käytettäviä omenalajikkeita vertaillaessa voidaan jo nyt todeta ainakin kahden lajikkeen olevan kestävämpiä kuin muiden sumutuskokeessa käytettyjen lajikkeiden: Glosterin ja Santanan. Haavatartutetuista näyteomenalajikkeista Golden Delicious lajikkeella tautioireet etenivät hitainten. Näitä positiivisilla ominaisuuksilla varustettuja omenalajikkeita kannattaa tulevaisuudessa suosia etenkin tiloilla joilla säilötään omenoita yli 3 kuukautta tai ollaan luonnonmukaisessa viljelyssä.

11 KIITOKSET

Haluan kiittää Luonnonvarakeskuksen Piikkiön toimipisteen henkilökuntaa tutkielman aineiston keräämisen avustamisessa ja tutkielman toteutuksen mahdollistamisessa. Kiitos Luonnonvarakeskuksen tutkija Tuuli Haikoselle työn ohjauksesta sekä yliopistonlehtori Asko Hannukkalalle avusta tilastoanalyysien tekemisessä sekä työn kirjoittamisen viimeistelyssä.

12 LÄHTEET

- Ahmadi-Afzadi, M., Tahir, I. & Nybom, H. 2013. Impact of harvesting time and fruit firmness on the tolerance to fungal storage diseases in an apple germplasm collection. *Postharvest Biology and Technology* 82: 51–58.
- Bakkeren, G., Kronstad, J., W. & Lévesque C., A. 2000. Comparison of AFLP Fingerprints and ITS Sequences as Phylogenetic Markers in *Ustilaginomycetes*. *Mycologia* 92: 510–521.
- Bianchi G. 1995. Plant waxes. Teoksessa : Hamilton, R. J. (toim) *Waxes: chemistry, molecular biology and functions*. Oily, Dundee. 175–222 s.
- Bielenin A. 1987. Resistance of *Pezizula alba* Gunthr. to benzimidazole fungicides in Poland. *Fruit Science Reports* 14: 29–34.
- Biggs, A.R., 1995. Detection of latent infections in apple fruits with paraquat. *Plant Disease* 79: 1062–1067.
- Borecka, H. 1962. *Pezizula malieortidis* as a pathogen on apple during the period of storage. *Acta Agrobotanica* 12, s. 13–66.
- Børve, J., Røen, D. & Stensvand, A. 2013. Harvest Time Influences Incidence of Storage Diseases and Fruit Quality in Organically Grown ‘Aroma’ Apples. *European Journal of Horticultural Science* 78 (5): 232–238.
- Brady, C.J. 1987. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 155–178.
- Brooks, C., Cooley, J., S. & Fisher, D., F. 1920. Diseases of apples in storage. Farmers bulletin 1160 United States Department of Agriculture. Contribution from the Bureau of Plant Industry. Chief Taylor, WM., A. Washington D. C.

- Burchill, R.T. & Edney, K.L., 1961. The assessment of spore production by *Gloeosporium album* and its relation to fruit infection. Annual Report of the East Malling Research Station s. 90–93.
- Cameldia, I., Neria, F., Menghinia, M., Pirondib, A., Nannib, I., M., Collinab, M. & Mari, M. 2017. Characterization of *Neofabraea vagabunda* isolates causing apple bull's eye rot in Italy (Emilia-Romagna region). Plant Pathology 66: 1432–1444.
- Cameldia, I., Neria, F., Ventrucci, D., Ceredi, G., Muzzi, E. & Mari, M. 2016. Influence of harvest date on bull's eye rot of 'Cripps Pink' apples and control chemical strategies. Plant Disease Journal 100 (11): 2287–2293.
- Campbell, C., L. & Madden, L., V. Introduction to plant disease epidemiology. A Wiley-Interscience publication. Canada. Luku 8 Temporal analysis of epidemic I: description and comparison of disease progress curve s. 161–201.
- Chen, C., Verkely, G., J., M., Sun, G., Groenewald, J., Z. & Crous P. W. 2016. Redefining common endophytes and plant pathogens in *Neofabraea*, *Pezicula* and related genera. Fungal Biology 120 (11): 1291–1322.
- de Jong, S., N., Lévesque, C., A., Verkley, G., J., M., Abeln, E., C., A., Rahe, J., E. & Braun, P., G. 2001. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. Mycological Research 105 (6): 658–669.
- Einax, E. & Voigt, K. 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. Organisms Diversity & Evolution 3 (3): 185–194.
- Gariépy, T. D., Lévesque, C. A., de Jong, S. N. & Raihe, J. E. 2003. Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. The British Mycological Society. Mycological Research 107 (5): 528–536.
- Grove, G. G. 1990. Anthracnose and perennial canker. Pages 36-38 Teoksessa: Compendium of Apple and Pear Diseases. Jones, A., L. & Aldwinckle H., S. (toim.). American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 36–38 s.
- Henriquez, J., L., Sugar, D. & Spotts, R., A. 2004. Etiology of Bull's Eye Rot of Pear Caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. Plant Disease 88: 1134–1138.
- Henriquez, J. L., Sugar, D., & Spotts, R. A. 2006. Induction of cankers on pear tree branches by *Neofabraea alba* and *N. perennans*, and fungicide effects on conidial production on cankers. Plant Disease 90: 481–486.

- Hortova, B., Novotny, D., & Erban, T. 2014. Physiological Characteristics and Pathogenicity of eight *Neofabraea* Isolates from Apples in Czechia. *European Journal of Horticultural Science* 79 (6): 327–334.
- Hughes, L. 2000. Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution*, 15 (2): 56–61.
- Hulme, A. c., Edney, K. L. 1960. Phenolic substances in the peel of Cox's Orange Pippin apples with reference to infection by *G. perennans*. *Teoksessa: Phenolics in Plants in Health and Disease*. Pridham, J., R. (toim.). 87–94 s.
- Hårdh, J., E. 1955. Omenarupi ja sen torjunta. *Valtion maatalouskoetöiminnan julkaisu* 144: 43 s.
- Index Fungorum. 2017. Otettu 10.4.2017 <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=3452>
- Ippolito, A., El-Ghaouth, A., Wilson, C., L. & Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 265–272.
- Jamalainen, E., A. 1953. Omenien varastoimisesta. *MAATALOUSKOELAITOKSEN KASVI-TAUTIOSASTON TIEDONANTOJA*. Ylipainos Puutarha-lehti 9 ja 10.
- Jha, G., Thakur, K. & Thakur, P. The *Venturia* Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses. *Journal of biomedicine and biotechnology*.
- John, M., A. & Dey, P., M. 1986. Postharvest changes in fruit cellwall. *Advances in Food Research* 30: 139–193.
- Johnston, J., W., Gunaseelan, K., Pidakala, P., Wang, M. & Schaffer, R., J. 2009. Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *Journal of Experimental Botany* 60: 2689–2699.
- Kays, S., J. & Paull, R., E. 2004a. Secondary metabolic processes and products. *Teoksessa Postharvest biology. Secondary metabolic processes in harvested products*. 137–208 s.
- Kays, S., J. & Paull, R., E. 2004b. Stress in harvested products. *Teoksessa Post harvest biology. Secondary metabolic processes in harvested products*. 355–402 s.
- Knee, M. 1973. Polysaccharide changes in cell walls of ripening apples. *Phytochemistry* 12: 1543–1549.
- Koch, K., Barthlott, W., Koch, S., Holmes, A., Wandelt, K., Mamdouh, W., DeFeyter, S. & Broekmann, P. 2006. Structural analysis of wheat wax *Triticum aestivum* c.v. 'Naturarstar' L. *Planta* 223: 258–270

- Koch, K., Neinhuis, C., Ensikat, H., J. & Barthlott, W. 2004. Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). *Journal of Experimental Botany*, 55: 711–718
- Konarska, A. 2013. The structure of the fruit peel in two varieties of *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) before and after storage. *Protoplasma*, 250: 701–714
- Kumar, R., Khurana, A. & Sharma A. K. 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany* 65 (16): 4561–4575
- Lata, B. 2007. Relationship between Apple Peel and the Whole Fruit Antioxidant Content: Year and Cultivar Variation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55: 663–671.
- Lee, S., B., Milgroom, M., G. & Taylor, J., W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* 35: 23–24.
- Lehtonen, T. 2016. Mehiläiset (omena) tautien torjunnassa. Suomen mehiläishoitajain liiton pölyttäjäpalveluseminaarit. Lohja 18.2.2016
- Li, L., Xihong, L., Zhajoun, B. & Yunhong, J. 2014. Variation in Antioxidant Metabolites and Enzymes of ‘Red Fuji’ Apple Pulp and Peel During Cold Storage. *International Journal of Food Properties* 17 (5): 1067–1080.
- Luonnonvarakeskus. 2017. Otettu 15.4.2017. Puutarhatilastot, Marjan- ja hedelmänviljely avomaalla. <http://statdb.luke.fi/PXWeb/sq/6961c9b4-c1fd-4aae-bfb5-c691b9c3c01a>
- Meurman, O. & Collan, O. 1943. Suomen hedelmäpuut ja viljeltyt marjat. Ensimmäinen osa, omenat. S. 134–140.
- Michalecka, M., Bryk, H., Poniatowska, A. & Puławska, J. 2016. Identification of *Neofabraea* species causing bull’s eye rot of apple in Poland and their direct detection in apple fruit using multiplex PCR. *Plant Pathology* 65: 643–654.
- Nannfeldt, J., A. 1932. Studien über die morphologie und systematik dernicht-lichenisierten inoperculaten discomycetenser. 4. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* 8 :1–368.
- Neinhuis, C., Koch, K. & Barthlott, W. 2001. Movement and regeneration of epicuticular waxes through plant cuticles. *Planta* 213:427–434
- Nybom, H., Røen, D., Karhu, S., Garkava-Gustavsson, L., Tahir, I., Haikonen, T., Røen, K., Ahmadi-Afzadi, M., Ghasemkhani, M., Sehic, J. & Hjeltne, S.-H. 2016: Pre-breeding

- for future challenges in Nordic apples: susceptibility to fruit tree canker and storage dis-eases. *Acta Horticulturae* 1127: 117–123.
- OECD. 2009. Fruit and vegetable scheme. Guidelines to objective tests to determinate quality of fruit and vegetable, dry and dried products. Guidelines on Objective Testing.
- Palm, G. & Weber, R., W., S. 2007. Resistenz von Bitterfäule Erregern gegen Benzimidazole im Kernobst. *Obstbau* 32: 490–494.
- Palmiter D. H. 1951. Blossom end rot of apples in New York caused by *Botrytis*. *Plant Disease Reporter* 35: 435.
- Prasanna, V., Prabha, T., N. & Tharanathan, R., N. 2007. Fruit Ripening Phenomena – An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (1): 1–19
- Qiagen. 2009. TissueLyser LT Handbook. Purification of DNA from Plant Tissues.
- Qiagen. 2015. DNeasy Plant Handbook 06/2015. Purification of total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)
- Rinallo, C. & Mori, B. 1996. Damage in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit exposed to different levels of rain acidity. *Journal of Horticultural Science* 71: 17–23.
- Saario, M. 2007. Hedelmänviljely. Teoksessa: Omenan viljely. Toim. Tahvonen, R. Puutarhaliiton julkaisu 345: 11–19 s.
- Sanderson, P., G. & Spotts, R., A. 1995. Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *penicillium*. *Phytopathology* 85 (1): 103–110.
- Sedgwick, P. 2012. Pearson's correlation coefficient. *British Medical Journal* 345.
- Snowdon, A.L., 1990. *Gloeosporium* rot. Teoksessa: A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. General introduction and fruits, vol. 1. Wolfe Scientific Ltd., London. S. 186–187
- Soto-Alvear, S., Lolas, M., Rosales, I., M., Chávez, E., R., & Latorre, B., A. 2013. Characterization of the bull's eye rot of apple in Chile. *Plant Disease* 97:485–490.
- Spotts, R., P., Seifert, K., A., Wallis, K., M., Sugar, D., Xiao, C., L., Serdani, & M. Henriquez, J., L. 2009. Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing districts in the Pacific Northwest USA. *British Mycological* 113: 1301–1311.
- Stigler, M., S. 2008. The Epic Story of Maximum Likelihood. *Statistical Science* 22 (4): 598–620.

- Streif, J. 1983. Der optimale erntetermin beim apfel. Qualitätsentwicklung und reife. Gartenbauwissenschaft 48: 154–159.
- Streif, J. 1996. Optimum harvest date for different apple cultivars in the 'Bodensee' area. Teoksessa: Determination and prediction of optimum harvest date of apples and pears. COST 94. The postharvest treatment of fruit and vegetables. de Jager, A., Johnson, D. Hohn, E. (toim). Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 15–20 s.
- Tahir, I. I., Ahmadi-Afzadi, M., Nybom, H. & Dey, E., S. 2014. Rye Bran Alkylresorcinols Inhibit Growth of *Penicillium expansum* and *Neofabraea perennans* In Vitro and In Vivo on Different Apple Cultivars. European Journal of Horticultural Science 79: 218–225.
- Tahir, I. I. & Jönsson, Å. 2005. Organic production of apple for industrial use. Acta Horticulturae, 682: 723–730.
- Tahir, I., I., Nybom, H., Ahmadi-Afzadi, M., Røen, K., Sehic, J. & Røen, D. 2015. Susceptibility to blue mold caused by *Penicillium expansum* in apple cultivars adapted to a cool climate. European Journal Of Horticultural Science 80 (3): 117–127.
- Tuovinen, T., Parikka, P. & Segerstedt M. 2010. Kasvinsuojeluseuran julkaisuja 101. Omenan taudit, tuhoeläimet ja hyötyeliöt.
- Verhoeff, K., 1974. Latent infections by fungi. Annual Review of Phytopathology, 12: 99–110.
- Verkely, G., J., M. 1999. A monograph of *Pezizula* and its anamorphs. Studies in Mycology 44: 1–176.
- Verkley, G., J., M., Zijlstra, J., D., Summerbell, R., C., Berendse, F. 2003. Phylogeny and taxonomy of root-inhabiting *Cryptosporiopsis* species, and *C. rhizophila* sp. nov., a fungus inhabiting roots of several Ericaceae. Mycological Research 107: 689–698.
- von Arx, J., A. 1957. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze. Verhandelingen Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde 51: 1–153.
- Wang, J.-P., Xu, Y.-P., Zang, X.-P., Li, S.-S. & Cai, X.-Z. 2016. *Sclerotinia sclerotiorum* virulence is affected by mycelial age via reduction in oxalate biosynthesis. Journal of Integrative Agriculture 15 (5): 1034–1045.
- Weber R. W. S & Dralle N. 2013. Fungi associated with Blossom-rot of apples in Germany. European Journal of Horticultural Science 78 (3): 97–105.

- Weber, R., W., S. & Palm, G. 2010. Resistance of storage rot fungi *Neofabraea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117 (4): 185–191.
- Wills, R., B., H., McGlasson, W., B., Graham, D., Lee, T., H. & Hall, E., G. 1898. Postharvest, an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables: 103
- Wu, Z., H., Wang, T., H., Huang, W. & Qu, Y., B. 2001. A simplified method for chromosome DNA preparation from filamentous Fungi. *Mycosystema* 20: 575–577.
- Xu, X.-M. & Robinson, J., D. 2000. Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits by conidia. *Plant Pathology* 49: 201–206.
- Ylämäki, A., Laurinen, E. 1997. Uusi menetelmä omenarupi-itiöiden lennon arviointiin. *Kasvinsuojelulehti* 29 (2): 41–43.
- Zhang, Y., Lubberstedt, T. & Xu, M.L. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 23–35.

LIITE 1. TARTUTUKSISSA KÄYTETYT OMENALAJIKKEET JA KÄYTETYT TARTUTUSMENETELMÄT LAJIKEKOHTAISESTI.

Taulukko 8. Kokeessa käytetyt lajikkeet, poimintapäivämäärät, tartututisoltaatit ja käytetyt tartutusmenetelmät lajikekohtaisesti.

Lajike	Kesä- / Syys- / Tal- vilajike	Poiminta-pvm	Haavoitustartu- tus T25	Haavoitustartu- tus, muut iso- laatit	Itiötartutukset
Pirja	K	1.8.2016	5.8.2016	5.8.2016	
Julyred	K(myöh)	13.8.2016	18.8.2016		
Orlinka	K(myöh)	13.8.2016	18.8.2016		
Y936	K	13.8.2016	18.8.2016		
Geneva					
Early	K	14.8.2016	18.8.2016		
Junost	K	14.8.2016	18.8.2016		
Lavia	K(myöh)	14.8.2016	18.8.2016	30.8.2016	
Samo	K	14.8.2016	18.8.2016		
Valkea- kuulas	K	14.8.2016	18.8.2016		

Valkea-					
lan Syys	K	20.8.2016	25.8.2016		
Norland	K	23.8.2016	25.8.2016		
Sävsta-					
holm	K	23.8.2016	2.9.2016		5.9.2016; 8.9.2016
Jaspi	S(aik)	25.8.2016	2.9.2016		
Suislep-					
per	K(myöh)	26.8.2016	2.9.2016		
Saima	K	29.8.2016	2.9.2016		
Discovery	S	31.8.2016	2.9.2016	20.9.2016	5.9.2016; 8.9.2016
Eppulai-					
nen	S(myöh)	6.9.2016	16.9.2016	20.9.2016	12.9.2016; 14.9.2016
Luotsi	S	6.9.2016	16.9.2016	20.9.2016	12.9.2016; 14.9.2016
Kirknie-					
men Talvi	T	6.9.2016	16.9.2016		12.9.2016
Sariola	S(myöh)	7.9.2016			12.9.2016; 14.9.2016
Heta	S	1.9.2016	16.9.2016		
Pekka	S	5.9.2016	16.9.2016		
Kaiku-					
vuori	T	13.9.2016	26.9.2016		
Krista	T	13.9.2016	26.9.2016		21.9.2016
Imrus	T	16.9.2016	26.9.2016		21.9.2016
Sariola	S(myöh)	31.8.2016	20.9.2016	20.9.2016	
Konsta	T	13.9.2016			28.9.2016
Juuso	T	13.9.2016		10.10.2016	27.9.2016
Atlas	T	16.9.2016		4.10.2016	27.9.2016
Åkerö	T	19.9.2016		10.10.2016	28.9.2016
Aroma	T	16.9.2016		4.10.2016	23.9.2016
Amorosa	T	16.9.2016		4.10.2016	23.9.2016
Zarya					
Alatau	T	22.9.2016		10.10.2016	27.9.2016
Lepaan					
Liereä	T	15.9.2016	13.10.2016		29.9.2016
Kangas-					
alan Talvi	T	22.9.2016	13.10.2016		3.10.2016
Punaka-					
neli	S	22.9.2016	13.10.2016	10.10.2016	29.9.2016
Yläkauttu	T	22.9.2016	13.10.2016		
Turso	T	27.9.2016	14.10.2016		
Linnan					
omena	S(myöh)	27.9.2016	14.10.2016		3.10.2016
Särsö	S(myöh)	27.9.2016	14.10.2016		5.10.2016
Jalmari	T	27.9.2016	14.10.2016		
Peltolan					
omena	S	27.9.2016	13.10.2015		
Svarthol-					
man Talvi	T	27.9.2016	14.10.2016		

Santana	T	26.9.2016		30.9.2016	30.9.2016
Valtti	T	23.9.2016?	13.10.2016		5.10.2016
Elise	T	6.10.2016		11.10.2016	11.10.2016
Rubin	T	6.10.2016		11.10.2016	11.10.2016
Lobo	T	4.10.2016	17.10.2016		
Anto- novka	T	23.9.2016	17.10.2016		
Golden					
Delicious	T	16.10.2016	24.10.2016		24.10.2016
Gloster	T	16.10.2016		20.10.2016	20.10.2016

LIITE 2. LAJIKKEIDEN AUDPC-ARVOT

Taulukko 9. Haavoitustartutetut kesälajikkeet.

Lajike	Käsittely	AUDPC ka	Keskihajonta	N	P
Samo	M	0,00	0,00	6	
	T25	149,67	11,48	12	0,0084
Norland	M	0,00	0,00	3	
	T25	132,36	41,64	11	<0,0001
Y1936	M	0,00	0,00	6	
	T25	201,75	17,91	12	0,0831
Valkeakuulas	M	0,00	0,00	6	
	T25	250,67	18,00	12	<0,0001
July Red	M	0,00	0,00	6	
	T25	164,55	10,74	11	0,1824
Orlinka	M	0,00	0,00	6	
	T25	199,83	24,69	12	0,1159
Junost	M	0,00	0,00	6	
	T25	231,33	19,02	12	<0,0001
Geneva Early	M	0,00	0,00	6	
	T25	181,08	13,53	12	
Lavia	M	0,00	0,00	12	
	T21	162,00	5,86	12	> 0,05
	T25	147,61	20,85	18	< 0,05
	T42	200,42	16,95	12	< 0,05
	T44	167,67	13,85	12	> 0,05
Valkealan Syys	M	0,00	0,00	6	
	T25	134,06	31,29	18	<0,0001
Yht.	M	0,00	0,00	63	
	T21	162,00	5,86	12	<0,0001
	T25	176,22	44,84	130	<0,0001
	T42	200,42	16,95	12	<0,0001

T44 167,67 13,85 12 <0,0001

N on AUDPC-arvoa laskettaessa käytettyjen omenoiden määrä. P on lajikkeen suurimman estimaatin vertailuarvo keskiarvoisimmasta lajikkeesta.

Taulukko 10. Haavoitustartutetut syyslajikkeet.

Lajike	Käsittely	AUDPC ka	Keskihajonta	N	P
Discovery	M	30,34	36,81	16	
	T21	349,69	84,86	8	0,0002
	T25	435,11	155,79	27	0,5995
	T42	390,28	279,39	9	0,0150
	T44	392,33	39,73	9	0,6339
Eppulainen	M	20,23	3,09	15	
	T21	386,50	53,38	6	0,0120
	T25	419,90	82,03	29	0,9449
	T42	552,83	46,14	6	0,7202
	T44	383,08	21,87	6	0,5091
Heta	M	23,25	1,50	4	
	T25	349,89	65,96	18	0,0127
Jaspi	M	45,90	64,13	5	
	T25	451,44	45,44	18	0,3005
Kirkniemen Talvi	M	20,83	0,75	6	
	T25	325,39	25,84	18	0,0008
Luotsi	M	22,00	5,04	14	
	T21	479,67	38,29	6	
	T25	421,64	69,67	29	
	T42	584,08	73,60	6	
	T44	410,17	24,15	6	
Pekka	M	19,17	0,75	6	
	T25	315,72	32,44	18	0,0002
Saima	M	108,50		1	
	T25	530,11	56,68	18	0,0002
Sariola	M	19,67	4,30	9	
	T21	417,50	80,28	6	0,0938
	T25	485,68	58,57	11	0,0594
	T42	516,60	7,68	5	0,4609
	T44	342,67	160,23	6	0,0998
Suislepp	M	20,00	2,10	6	
	T25	589,94	102,05	17	<0,0001
Sävestaholm	M	38,50	39,68	4	
	T21	598,00	106,77	2	0,0241

	T25	398,85	205,58	17	0,4369
	T42	18,00	0,00	3	-
	T44	546,00	8,49	2	0,0192
Yht.	M	25,80	25,12	86	
	T21	417,70	95,55	28	<0,0001
	T25	426,41	121,82	220	<0,0001
	T42	447,28	227,38	29	> 0,05
	T44	394,43	86,75	29	<0,0001

N on AUDPC-arvoa laskettaessa käytettyjen omenoiden määrä. P on lajikkeen suurimman estimaatin vertailuarvo keskiarvoisimmasta lajikkeesta.

Taulukko 11. Haavoitustartutetut talvilajikkeet.

Omenalajike	Käsittely	AUDPC ka	Keskihajonta	N	P
Amorosa	M	170,75	241,48	2	
	T21	578,29	87,48	12	0,5583
	T25	570,55	37,52	11	0,2968
	T42	531,88	115,85	12	0,2759
	T44	593,38	65,81	12	0,9820
Antonovka	M	0,00	0,00	6	
	T25	645,79	80,32	12	0,0078
Aroma	M	73,50	66,48	4	
	T21	568,13	63,27	12	0,7336
	T25	523,58	46,94	12	0,9533
	T42	503,83	76,82	12	0,0616
	T44	562,09	99,41	11	0,5501
Atlas	M	158,50	73,54	2	
	T21	703,71	73,30	12	0,0003
	T25	682,58	157,78	12	0,0006
	T42	663,38	65,02	12	0,0103
	T44	696,00	104,17	12	0,0583
Elise	M	0,00	0,00	6	
	T21	838,92	169,89	6	<0,0001
	T25	503,33	34,51	6	0,7468
	T42	475,08	90,44	6	0,0209
	T44	721,75	262,86	6	0,0398
Gloster	M	0,00	0,00	6	
	T21	534,25	34,28	6	0,6802
	T25	500,08	46,09	6	0,7018
	T42	398,83	67,58	6	<0,0001
	T44	606,08	37,47	6	0,8525
Golden Delicious	M	0,00	0,00	6	
	T25	221,96	148,87	12	<0,0001
Imrus	M	0,00	0,00	6	

	T25	533,08	44,14	20	0,3411
Jalmari	M	0,00	0,00	6	
	T25	580,96	50,04	12	0,2002
Juuso	M	13,75	33,68	6	
	T21	683,90	54,28	5	0,0097
	T25	549,50	73,11	3	0,6658
	T42	652,75	27,08	4	0,0788
	T44	670,25	56,76	4	0,2738
Kaikuvuori	M	0,00	0,00	6	
	T25	499,27	81,86	24	0,6148
Kangasalan talvi	M	0,00	0,00	5	
	T25	490,33	67,97	12	0,5158
Krista	M	0,00	0,00	5	
	T25	469,27	114,56	24	0,2288
Lepaan liereä	M	0,00	0,00	3	
	T25	499,17	60,35	6	<0,0001
Linnan omena	M	0,00	0,00	5	
	T25	652,21	48,01	12	0,0051
Lobo	M	0,00	0,00	6	
	T25	669,71	30,75	12	0,0015
Peltolan omena	M	0,00	0,00	6	
	T25	322,00	46,22	9	<0,0001
Punakaneli	M	11,10	35,10	10	
	T21	689,90	31,24	5	0,2024
	T25	592,65	105,60	17	0,1072
	T42	700,58	56,66	6	0,0018
	T44	636,25	205,37	6	0,5005
Rubin	M	0,00	0,00	6	
	T21	914,83	81,70	6	<0,0001
	T25	561,92	34,21	6	0,4484
	T42	540,50	95,88	6	0,4617
	T44	909,50	71,71	6	<0,0001
Santana	M	0,00	0,00	6	
	T21	520,50	40,71	7	0,4681
	T25	479,60	56,37	5	0,4682
	T42	527,67	39,49	6	0,2961
	T44	586,83	71,58	6	0,9003
Svartholma	M	0,00	0,00	5	
	T25	683,88	36,04	12	0,0005
Särsö	M	5,00	12,25	6	
	T25	811,04	90,23	12	<0,0001
Turso	M	0,00	0,00	5	
	T25	538,21	68,26	12	0,7113
Valtti	M	0,00	0,00	6	
	T25	344,88	40,70	12	0,0002
Yläkauttu	M	12,08	29,60	6	
	T25	538,54	64,98	12	0,7060

Zarya Alatau	M	6,00	14,70	6	
	T21	543,33	34,02	6	0,8238
	T25	492,17	52,69	6	0,5969
	T42	528,92	44,64	6	0,3102
	T44	584,00	55,32	6	0,8641
Åkerö	M	0,00	0,00	6	
	T21	554,00	40,74	6	
	T25	520,83	62,65	6	
	T42	571,08	63,22	6	
	T44	594,58	69,30	6	
Yht.	M	8,68	38,91	148	
	T21	638,87	137,36	83	<0,0001
	T25	538,59	140,98	305	<0,0001
	T42	554,34	109,14	82	<0,0001
	T44	644,08	141,13	81	<0,0001

N on AUDPC-arvoa laskettaessa käytettyjen omenoiden määrä. P on lajikkeen suurimman estimaatin vertailuarvo keskiarvoisimmasta lajikkeesta.

Taulukko 12. Harsotartutetut lajikkeet.

Lajike	Käsittely	AUDPC keskiarvo	Keskihajonta	N	P
Amorosa	M	0,00	0,00	6	
	T21	160,82	134,03	7	0,0343
	T44	270,16	322,03	8	0,3785
Aroma	M	0,00	0,00	6	
	T21	82,40	98,36	5	0,0058
	T44	121,25	157,92	7	0,4082
Atlas	M	21,88	53,58	6	
	T21	152,08	155,10	9	0,0164
	T44	165,64	127,47	11	0,7081
Discovery	M	0,00	0,00	8	
	T21	299,57	218,66	7	0,6932
	T44	678,22	125,50	8	<0,0001
Elise	M	3,38	5,49	6	
	T21	238,20	303,73	10	0,1991
	T44	284,48	340,57	11	0,2517
Eppulainen	M	17,55	28,81	10	
	T21	127,45	150,26	10	0,0049
	T44	218,05	150,00	11	0,7671
Gloster	M	0,00	0,00	6	
	T21	61,63	76,43	8	0,0005
	T44	73,65	46,27	12	0,1127
Golden Delicious	M	4,13	10,10	6	

	T21	365,67	202,64	12	0,6198
	T44	421,31	198,61	12	0,0031
Imrus	M	6,63	15,50	6	
	T21	194,17	183,46	12	0,0473
	T44	151,13	170,48	8	0,6085
Juuso	M	10,35	23,14	5	
	T21	328,60	180,46	12	0,9683
	T44	313,29	256,73	12	0,1214
Kangasalan Talvi	M	13,00	31,84	6	
	T21	240,50	180,49	10	0,9683
	T44	138,05	143,55	11	0,4670
Kirkniemen talvi	M	0,00	0,00	5	
	T21	129,50	65,87	4	0,9683
	T44	114,35	32,89	5	0,4190
Konsta	M	43,69	87,38	4	
	T21	449,32	253,45	11	0,0953
	T44	485,16	130,43	11	0,0002
Krista	M	1,17	2,86	6	
	T21	243,88	171,59	10	0,2278
	T44	180,83	140,02	12	0,8540
Lepaa Liereä	M	41,25	76,59	6	
	T21	331,35	176,28	12	
	T44	194,90	185,45	12	
Linnan Omena	M	84,63	98,19	6	
	T21	439,79	240,28	12	0,1169
	T44	612,23	254,25	12	<0,0001
Lobo	M	16,00	34,31	6	
	T21	74,75	141,20	6	0,0025
	T44	76,33	71,56	3	0,3266
Luotsi	M	6,14	19,86	11	
	T21	111,69	94,35	4	0,0247
	T44	122,00	111,79	10	0,3632
Punakaneli	M	53,25	113,39	6	
	T21	382,56	205,96	12	0,4591
	T44	362,73	238,41	12	0,0281
Rubin	M	0,00	0,00	6	
	T21	167,20	120,87	10	0,0236
	T44	240,32	199,04	11	0,5611
Santana	M	0,00	0,00	6	
	T21	117,43	136,08	10	0,0032
	T44	132,18	127,66	10	0,4340

Sariola	M	8,48	16,09	10	
	T21	328,07	169,81	11	0,9629
	T44	262,00	104,85	5	0,5007
Särsö	M	127,92	85,25	6	
	T21	274,90	165,04	12	0,4143
	T44	393,21	251,26	12	0,0095
Sävstaholm	M	0,00	0,00	8	
	T21	172,07	114,86	7	0,0481
	T44	445,28	279,22	8	0,0034
Valtti	M	26,42	57,67	6	
	T21	135,23	146,49	11	0,0055
	T44	177,61	174,15	11	0,8250
Zarya Alatau	M	0,44	1,52	12	
	T21	40,69	73,26	9	<0,0001
	T44	38,07	25,98	7	0,0782
Åkerö	M	0,00	0,00	6	
	T21	473,18	200,94	11	0,0449
	T44	478,92	264,05	12	0,0002
Yht.	M	16,34	47,33	181	
	T21	247,54	210,63	254	<0,0001
	T44	277,66	248,18	264	<0,0001

AUDPC keskiarvo on aurinko- ja varjopuolen keskiarvo. N on AUDPC-arvoa laskettaessa käytettyjen omenoiden määrä. P on lajikkeen suurimman estimaatin vertailuarvo keskiarvoisimmasta lajikkeesta.

Taulukko 13. Sumutustartutetut lajikkeet.

Omenalajike	Käsittely	AUDPC keskiarvo	Keskihajonta	N	P
Amorosa	M	0,00	0,00	6	
	T21	33,38	108,68	13	0,0645
	T44	0,64	2,11	11	0,3330
Aroma	M	54,00	132,27	6	
	T21	25,75	54,62	12	0,0577
	T44	17,46	30,56	12	0,4021
Atlas	M	20,00	48,99	6	
	T21	55,04	106,69	12	0,1098
	T44	276,88	226,20	12	0,1499
Discovery	M	114,69	324,39	8	
	T21	52,63	141,63	8	0,1383
	T44	325,69	354,32	8	0,0881
Elise	M	1,67	4,08	6	
	T21	200,17	310,51	12	0,9064

Eppulainen	T44	129,92	235,33	12	0,8811
	M	96,50	189,87	9	
	T21	44,39	63,84	9	0,1087
Gloster	T44	140,04	306,59	14	0,8060
	M	4,83	8,01	6	
	T21	0,17	0,58	12	0,0309
Golden Delicious	T44	11,83	37,29	12	0,3750
	M	3,67	8,98	6	
	T21	53,54	69,30	12	0,1065
Imrus	T44	97,83	182,59	12	0,8949
	M	0,50	1,22	6	
	T21	70,42	112,79	12	0,1493
Juuso	T44	31,35	62,61	13	0,4671
	M	22,50	55,11	6	
	T21	314,92	396,22	12	0,2920
Kangasalan talvi	T44	529,67	489,73	12	0,0003
	M	2,58	4,08	6	
	T21	35,88	110,03	12	0,0727
Kirkniemen talvi	T44	59,38	112,07	12	0,6385
	M	0,00	0,00	4	
	T21	12,75	25,50	4	0,1302
Konsta	T44	0,00	0,00	4	0,4601
	M	24,67	39,23	6	
	T21	282,88	167,72	12	0,4675
Krista	T44	323,00	239,83	12	0,0650
	M	0,00	0,00	6	
	T21	127,88	258,27	12	0,3923
Lepaan liereä	T44	77,75	97,70	12	0,7578
	M	269,08	500,42	6	
	T21	73,38	105,96	12	0,1580
Linnan omena	T44	410,63	389,14	12	0,0089
	M	246,33	283,00	6	
	T21	588,25	497,43	12	0,0001
Luotsi	T44	877,04	453,79	12	<0,0001
	M	22,22	66,67	9	
	T21	313,17	350,51	9	0,3306
Punakaneli	T44	157,60	416,73	15	0,6822
	M	403,00	358,84	6	
	T21	378,88	339,22	12	0,0879
	T44	592,58	381,75	12	<0,0001

Rubin	M	1,67	4,08	6	
	T21	112,21	145,29	12	0,3099
	T44	108,38	138,88	12	0,9685
Santana	M	0,00	0,00	6	
	T21	0,83	2,33	12	0,0314
	T44	6,67	14,21	12	0,3511
Sariola	M	48,89	71,01	9	
	T21	106,61	212,98	9	0,3137
	T44	51,39	105,79	14	0,5782
Särsö	M	0,00	0,00	6	
	T21	788,29	261,48	12	<0,0001
	T44	998,88	291,64	12	<0,0001
Sävsstholm	M	36,56	71,20	8	
	T21	211,69	290,17	8	
	T44	112,88	204,53	8	
Valtti	M	91,20	195,65	5	
	T21	439,92	356,55	12	0,0198
	T44	156,67	276,44	12	0,7006
Zarya Alatau	M	79,42	171,65	6	
	T21	41,67	122,71	12	0,0827
	T44	168,04	266,82	12	0,9300
Åkerö	M	0,00	0,00	6	
	T21	30,67	62,54	12	0,0646
	T44	122,88	204,83	12	0,9300
Yhteensä	M	60,11	180,26	166	
	T21	174,39	293,91	288	< 0,001
	T44	226,25	361,08	303	< 0,001

N on AUDPC-arvoa laskettaessa käytettyjen omenoiden määrä. P on lajikkeen suurimman estimaatin vertailuarvo keskiarvoisimmasta lajikkeesta.

LIITE 3 ITIÖTARTUTETTUIJEN LAJIKKEIDEN TARTUTUSTEN TARTUNTAPROSENTIT

Taulukko 14. Harsotartutettujen lajikkeiden tartutusten infektioprosentit.

Lajike	Käsittely	Aurinkopuoli (%)	Varjopuoli (%)	Aurinko- tai varjopuoli sairastunut (%)
Amorosa	T21	41,67	33,33	58,30
Amorosa	T44	50,00	41,67	66,00
Amorosa	M	0,00	0,00	0,00
Aroma	T21	16,67	25,00	41,60

Aroma	T44	25,00	25,00	41,60
Aroma	M	0,00	0,00	0,00
Atlas	T21	33,33	58,33	75,00
Atlas	T44	58,33	75,00	91,60
Atlas	M	0,00	0,00	0,00
Discovery	T21	62,50	75,00	87,50
Discovery	T44	100,00	100,00	100,00
Discovery	M	0,00	0,00	0,00
Elise	T21	66,67	66,67	83,30
Elise	T44	66,67	66,67	91,60
Elise	M	16,67	33,00	33,00
Eppulainen	T21	72,73	54,55	81,80
Eppulainen	T44	54,55	72,73	100,00
Eppulainen	M	50,00	16,67	66,67
Gloster	T21	33,33	25,00	41,60
Gloster	T44	75,00	58,33	83,30
Gloster	M	0,00	0,00	0,00
Golden Delicious	T21	83,33	91,67	91,60
Golden Delicious	T44	100,00	91,67	100,00
Golden Delicious	M	16,67	16,67	16,67
Imrus	T21	91,67	91,67	100,00
Imrus	T44	16,67	50,00	58,30
Imrus	M	16,67	0,00	16,67
Juuso	T21	91,67	100,00	100,00
Juuso	T44	75,00	91,67	91,60
Juuso	M	33,33	0,00	33,33
Kangasalan Talvi	T21	66,67	58,33	91,60
Kangasalan Talvi	T44	58,33	66,67	91,60
Kangasalan Talvi	M	16,67	16,67	16,67
Kirkniemen Talvi	T21	80,00	80,00	80,00
Kirkniemen Talvi	T44	80,00	80,00	80,00
Kirkniemen Talvi	M	0,00	0,00	0,00
Konsta	T21	91,67	91,67	91,60
Konsta	T44	83,33	91,67	91,60
Konsta	M	0,00	25,00	25,00
Krista	T21	75,00	66,67	83,30
Krista	T44	91,67	100,00	100,00
Krista	M	0,00	16,67	16,67
Lepaan Liereä	T21	83,33	75,00	100,00
Lepaan Liereä	T44	100,00	66,67	100,00
Lepaan Liereä	M	33,00	16,67	50,00
Linnan Omena	T21	100,00	100,00	100,00
Linnan Omena	T44	100,00	100,00	100,00
Linnan Omena	M	50,00	83,33	83,33
Lobo	T21	25,00	41,67	50,00

Lobo	T44	16,67	0,00	16,00
Lobo	M	16,67	16,67	33,00
Luotsi	T21	60,00	80,00	80,00
Luotsi	T44	72,73	75,00	90,90
Luotsi	M	33,00	16,67	33,00
Punakaneli	T44	91,67	100,00	100,00
Punakaneli	T21	91,67	100,00	100,00
Punakaneli	M	16,67	33,00	33,00
Rubin	T21	50,00	66,67	83,30
Rubin	T44	100,00	66,67	91,60
Rubin	M	0,00	0,00	0,00
Santana	T21	33,33	83,33	91,60
Santana	T44	33,33	66,67	75,00
Santana	M	0,00	0,00	0,00
Sariola	T21	81,82	100,00	100,00
Sariola	T44	45,45	36,36	45,45
Sariola	M	0,00	33,00	33,00
Särsö	T21	83,33	83,33	100,00
Särsö	T44	66,67	91,67	83,30
Särsö	M	50,00	83,33	83,33
Sävsstaholm	T21	75,00	87,50	87,50
Sävsstaholm	T44	100,00	100,00	100,00
Sävsstaholm	M	0,00	0,00	0,00
Valtti	T21	50,00	58,33	83,30
Valtti	T44	41,67	91,67	91,60
Valtti	M	16,67	33,00	33,00
Zarya Alatau	T21	16,67	25,00	33,00
Zarya Alatau	T44	16,67	0,00	16,00
Zarya Alatau	M	0,00	16,67	16,67
Åkerö	T21	83,33	83,33	100,00
Åkerö	T44	91,67	100,00	100,00
Åkerö	M	0,00	0,00	0,00

Taulukko 15. Sumutustartutettujen näytelajikkeiden infektioprosentit ja valetartutettujen omenoiden spontaanintartunnan määrä.

Lajike	Sieni- kanta	Onnistuneet tartunnat (%)	Valetartutettujen omenoiden spon- taanitartunta (%)
Amorosa	T21	23,08	0,00
Amorosa	T44	9,09	
Aroma	T21	33,33	16,67
Aroma	T44	33,33	
Atlas	T21	41,67	16,67

Atlas	T44	83,33	
Discovery	T21	37,50	12,50
Discovery	T44	16,67	
Elise	T21	58,33	16,67
Elise	T44	58,33	
Eppulainen	T21	50,00	28,57
Eppulainen	T44	30,00	
Gloster	T21	16,67	33,33
Gloster	T44	25,00	
Golden Delicious	T21	41,67	33,33
Golden Delicious	T44	33,33	
Imrus	T21	50,00	16,67
Imrus	T44	50,00	
Juuso	T21	66,67	16,67
Juuso	T44	91,67	
Kangasalan Talvi	T21	16,67	33,33
Kangasalan Talvi	T44	33,33	
Kirkniemen Talvi	T21	25,00	0,00
Kirkniemen Talvi	T44	0,00	
Konsta	T21	91,67	33,33
Konsta	T44	91,67	
Krista	T21	33,33	0,00
Krista	T44	50,00	
Lepaan Liereä	T21	66,67	33,33
Lepaan Liereä	T44	83,33	
Linnan Omena	T21	83,33	100,00
Linnan Omena	T44	100,00	
Luotsi	T21	77,78	11,11
Luotsi	T44	46,67	
Punakaneli	T44	100,00	66,67
Punakaneli	T21	83,33	
Rubin	T21	58,33	16,67
Rubin	T44	58,33	
Santana	T21	16,67	0,00
Santana	T44	25,00	
Sariola	T21	50,00	22,22
Sariola	T44	27,27	
Särsö	T21	100,00	0,00

Särsö	T44	100,00	
Sävstaholm	T21	40,00	16,67
Sävstaholm	T44	20,00	
Valtti	T21	91,67	33,33
Valtti	T44	58,33	
Zarya Alatau	T21	50,00	33,33
Zarya Alatau	T44	75,00	
Åkerö	T21	33,33	0,00
Åkerö	T44	50,00	
